

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Obstetricia y Ginecología



**FALLO DE FECUNDACIÓN EN CICLOS DE
FERTILIZACIÓN “IN VITRO” Y MICROINYECCIÓN
ESPERMÁTICA: APROXIMACIÓN A SOLUCIONES.**

TESIS DOCTORAL

JOSE A. GRAGERA SEGURA

Directores:

D. Ignacio Zapardiel Gutiérrez

D. José Manuel Bajo Arenas

JUNIO 2010

Don Ignacio Zapardiel Gutiérrez, Doctor en Obstetricia y Ginecología, y miembro del Departamento de Obstetricia y Ginecología de la Universidad Autónoma de Madrid como director del Proyecto de Tesis presentado por Don José Antonio Gragera Segura, con el título:

“FALLO DE FECUNDACIÓN EN CICLOS DE FERTILIZACIÓN IN VITRO Y MICROINYECCIÓN ESPERMÁTICA: APROXIMACIÓN A SOLUCIONES”

INFORMA QUE:

El trabajo presentado por Don José Antonio Gragera Segura realizado bajo mi dirección, reúne los requisitos científicos, metodológicos, formales y de originalidad suficientes para ser defendido como Tesis Doctoral ante el Tribunal que legalmente proceda.

Y para que conste donde proceda, firmo el presente documento en Madrid a 8 de Junio de 2010.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Ignacio Zapardiel', with a large, stylized flourish extending from the end.

Dr. Ignacio Zapardiel Gutiérrez.

Don José Manuel Bajo Arenas, Catedrático de Obstetricia y Ginecología, y miembro del Departamento de Obstetricia y Ginecología de la Universidad Autónoma de Madrid como director del Proyecto de Tesis presentado por Don José Antonio Gragera Segura, con el título:

“FALLO DE FECUNDACIÓN EN CICLOS DE FERTILIZACIÓN IN VITRO Y MICROINYECCIÓN ESPERMÁTICA: APROXIMACIÓN A SOLUCIONES”

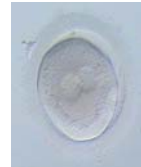
INFORMA QUE:

El trabajo presentado por Don José Antonio Gragera Segura realizado bajo mi dirección, reúne los requisitos científicos, metodológicos, formales y de originalidad suficientes para ser defendido como Tesis Doctoral ante el Tribunal que legalmente proceda.

Y para que conste donde proceda, firmo el presente documento en Madrid a 8 de Junio de 2010.



Prof. D. José Manuel Bajo Arenas.



“Todavía me sorprende, y seguiré haciéndolo a pesar de los años transcurridos, cuando vienen a vernos las felices parejas a las que hemos ayudado y nos enseñan el fruto de nuestro trabajo”.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a mis padres, que me dieron la oportunidad de poder estudiar la carrera que a mí me gustara, sin reparar en gastos, y eso que la economía no era muy boyante precisamente; de hecho soy el único universitario de toda mi familia.

En segundo lugar a mi mujer, Alfonsi, y a mis hijos, José Antonio y María, por los largos ratos que he dedicado a la Tesis y he dejado de dedicarles a ellos, aunque siempre he procurado que fueran los menos, pues en el mismo momento que mi nene me decía “ya estás otra vez con el libro”, refiriéndose al trabajo, lo dejaba para estar con mi familia, que ahora mismo es lo más importante de mi vida.

En tercer lugar a todos y cada uno de mis compañeros de profesión y de la clínica: embriólogos, técnicos de laboratorio, enfermeras, ginecólogas y urólogos, que siempre han estado ahí en el momento que los necesitaba. Desde los que me han ayudado a bucear en las, como se suele decir, procelosas aguas de la estadística, hasta los que me han explicado los protocolos que a mí se me pueden escapar más al no estar dentro de mi campo diario de actuación, como las diferentes pautas de medicación o el seguimiento de cada señora una vez finalizado el ciclo.

En cuarto lugar al Doctor Ignacio Zapardiel Gutiérrez y al Profesor Bajo Arenas, que me han guiado y orientado en este largo camino que emprendí hace ya tiempo.

ABREVIATURAS

- .- **A:** Astenozoospermia.
- .- **Ab:** Aborto.
- .- **Abor de rep:** Abortos de repetición.
- .- **ADN:** Ácido Desoxirribonucleico.
- .- **AMP_c:** Adenosín Monofosfato cíclico.
- .- **ASEBIR:** Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción.
- .- **ATP:** Adenosín Trifosfato.
- .- **Atre ó Atr:** Ovocitos atrésicos.
- .- **Beta +:** Embarazadas
- .- **Biol:** Biólogo.
- .- **Cal:** Calidad.
- .- **CCO ó CCCO:** Complejos Cúmulo-Corona-Ovocito.
- .- **cm:** Centímetros.
- .- **CP:** Corpúsculo Polar.
- .- **Cripto:** Criptozoospermia.
- .- **D 0:** Día de la punción y de la fecundación.
- .- **D+1:** Día siguiente al de la fecundación.
- .- **D+2:** Dos días después de la fecundación.
- .- **Dg:** Descongelados.
- .- **DGP ó DPI:** Diagnóstico Genético Preimplantacional.
- .- **Donac:** Donación.
- .- **DT:** Desviación Típica.
- .- **Embar:** Grupo de embarazadas.
- .- **Embr ó E:** Embriones.
- .- **Espont:** Embarazo espontáneo.
- .- **Esptz:** Espermatozoide.
- .- **F:** Estadístico de contraste.
- .- **Fallo:** Grupo con fallo de fecundación.
- .- **Fecund:** Ovocitos fecundados.
- .- **FISH:** Del inglés, “Fluorescence In Situ Hybridization”, análisis genético en espermatozoides. Puede ser normal o alterado.

- .- **FIV:** Fecundación o Fertilización “in Vitro”. También se utiliza para hablar de Fecundación “in Vitro” convencional, para diferenciarla de la fecundación “in vitro” con microinyección.
- .- **Folic:** Folículos maduros.
- .- **FRI:** Fallo Repetido de Implantación.
- .- **FSH:** Del inglés, “Follicle-Stimulating hormone”, hormona folículo estimulante.
- .- **gl:** Grados de libertad (estadística).
- .- **GnRH:** Del inglés, “Gonadotropin-releasing hormone”, Hormona liberadora de Gonadotropina.
- .- **HBV:** Del inglés, “Hepatitis B Virus”. Hepatitis B.
- .- **hCG:** Del inglés, “Human Corionic gonadotropin”, Gonadotropina Coriónica Humana.
- .- **HCV:** Del inglés, “Hepatitis C Virus”. Hepatitis C.
- .- **HIV:** Del inglés, “Human Immunodeficiency Virus”. En español, SIDA, “Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida”.
- .- **hMG:** Del inglés, “Human menopausal gonadotropin”, Gonadotropina Menopáusica Humana.
- .- **hs:** Horas.
- .- **HSA:** Del inglés, “Human Serum Albumin”, Albúmina Sérica Humana.
- .- **HSG:** Histerosalpingografía.
- .- **IAD:** Inseminación Artificial con semen de Donante.
- .- **IAH ó IAC:** Inseminación Artificial Homóloga o Conyugal.
- .- **ICSI:** Del inglés, “IntraCytoplasmic Sperm Injection”, inyección intracitoplasmática, o microinyección espermática.
- .- **IMC:** Índice de Masa Corporal.
- .- **IMSI:** Del inglés, “Intracytoplasmic Morphology selected Sperm Injection”, inyección intracitoplasmática de espermatozoides morfológicamente seleccionados.
- .- **Indicac:** Indicaciones.
- .- **Inmad:** Ovocitos inmaduros.
- .- **Insem:** Ovocitos inseminados.
- .- **Inyect:** Ovocitos inyectados.
- .- **IVE:** Interrupción Voluntaria del Embarazo.
- .- **IVF:** Del inglés, “In Vitro Fertilization”. Fecundación “in Vitro”.
- .- **LCF ó LFC:** Latido Cardíaco Fetal.

- .- **LH:** Del inglés, “Luteinizing hormone”, hormona luteinizante.
- .- **mg:** Miligramos.
- .- **Mhz:** Megahertzios.
- .- **M-I:** Ovocito en Metafase I. Inmaduro, pero con posibilidades de madurar “in vitro”.
- .- **M-II:** Ovocito en Metafase II. Maduro.
- .- **ml:** Mililitro.
- .- **mm:** Milímetro.
- .- **N:** Frecuencias.
- .- **N:** Necrozoospermia.
- .- **N₂ l:** Nitrógeno líquido.
- .- **O:** Oligozoospermia.
- .- **OATN:** Oligo-asteno-terato-necrozoospermia.
- .- **°C:** Grados Centígrados.
- .- **OMS:** Organización Mundial de la Salud.
- .- **Ovoc:** Ovocitos.
- .- **Ovodon:** Ovodonación. Donación de ovocitos.
- .- **p:** p-valor o nivel de significación (estadística).
- .- **Pac:** Pacientes.
- .- **PCR:** Del inglés, “Polymerase Chain Reaction”, reacción en cadena de la polimerasa.
- .- **P-I:** Ovocito en Profase I. Totalmente inmaduro.
- .- **PN:** Pronúcleo.
- .- **PRL:** Hormona Prolactina.
- .- **PTX:** Pentoxifilina.
- .- **PVP:** PoliVinil Pirrolidona.
- .- **REM:** Recuento de Espermatozoides Móviles. Es similar al TSE.
- .- **RIA:** Radio Inmuno Análisis.
- .- **ROS:** Del inglés “Reactive Oxygen Species”, especies reactivas de oxígeno.
- .- **SEF:** Sociedad Española de Fertilidad.
- .- **Sig:** Nivel crítico (estadística).
- .- **Signific:** Significancia (diferencia estadísticamente significativa).
- .- **SOP:** Síndrome de Ovario Poliquístico.
- .- **SPSS:** Del inglés, “Statistical Package for the Social Sciences”, programa estadístico.
- .- **t:** Estadístico de contraste.
- .- **T:** Teratozoospermia.

- .- **TESE:** Del inglés, “Testicular Sperm Extraction”, extracción testicular de espermatozoides, o biopsia testicular para la recuperación de gametos masculinos.
- .- **TESE+ICSI:** Microinyección espermática de espermatozoides procedentes de biopsia testicular.
- .- **típ:** Típica (desviación típica o error típico).
- .- **TPC:** Test Post-coital.
- .- **TRA:** Técnicas de Reproducción Asistida.
- .- **Trf ó transfer:** Transferencia embrionaria.
- .- **TSE:** Test de Supervivencia Espermática.
- .- **UI:** Unidades Internacionales.
- .- **Var:** Variable.
- .- **x:** Aumentos en un microscopio.
- .- **z:** Resultado de una ecuación con el cálculo de regresión logística.
- .- **ZP:** Zona Pelúcida del ovocito.
- .- **α :** Error (estadística). En nuestro caso del 5%. Intervalo de confianza: $1 - \alpha$ %.
- .- **β -hCG:** Subunidad beta de la gonadotropina coriónica humana.
- .- **μ g:** Microgramos.

ÍNDICE

I.- INTRODUCCIÓN	13
I.1.- Fallo de Fecundación.	14
I.2.- La Fecundación.	17
I.3.- Aproximación a soluciones en el Fallo de Fecundación.	19
II.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	26
III.- MATERIAL Y MÉTODO	28
III.1.- Diseño.	29
III.2.- Sujetos.	29
III.3.- Metodología.	38
III.4.- Análisis Estadístico.	43
IV.- RESULTADOS	45
IV.1.- Estadística descriptiva.	46
IV.1.A.- Grupo de Embarazadas.	46
IV.1.A.1.- Edad.	46
IV.1.A.2.- FSH.	46
IV.1.A.3.- Indicación.	47
IV.1.A.4.- Indicaciones femeninas.	48
IV.1.A.5.- Indicaciones masculinas.	49
IV.1.A.6.- Técnicas de Reproducción Asistida.	52
IV.1.A.7.- Folículos.	53
IV.1.A.8.- Ovocitos.	54
IV.1.A.9.- Ovocitos atrésicos.	54
IV.1.A.10.- Ovocitos inseminados.	55
IV.1.A.11.- Datos por Técnica de Reproducción Asistida.	56
IV.1.A.12.- Embriones en D+1.	60
IV.1.A.13.- Embriones en D+2 ó D+3.	61
IV.1.A.14.- Biólogo.	64
IV.1.A.15.- Embarazos a término y abortos.	65
IV.1.B.- Grupo con Fallo de Fecundación.	67
IV.1.B.1.- Edad.	67
IV.1.B.2.- FSH.	67
IV.1.B.3.- Esterilidad.	68
IV.1.B.4.- Indicación.	69
IV.1.B.5.- Indicaciones femeninas.	69
IV.1.B.6.- Indicaciones masculinas.	71
IV.1.B.7.- Número de ciclo.	72
IV.1.B.8.- Técnicas de reproducción asistida.	73

IV.1.B.9.- Folículos.	75
IV.1.B.10.- Ovocitos.	75
IV.1.B.11.- Ovocitos atrésicos.	76
IV.1.B.12.- Ovocitos inseminados.	76
IV.1.B.13.- Datos por Técnica de Reproducción Asistida.	77
IV.1.B.14.- Biólogo.	80
IV.1.B.15.- Ciclos anteriores al fallo de fecundación.	81
IV.1.B.16.- Ciclos posteriores al fallo de fecundación.	83
IV.2.- Estadística analítica.	88
IV.2.1.- Edad.	88
IV.2.2.- FSH.	90
IV.2.3.- Indicación.	91
IV.2.4.- Indicaciones femeninas.	92
IV.2.5.- Indicaciones masculinas.	93
IV.2.6.- Técnicas de Reproducción Asistida.	94
IV.2.7.- Folículos.	94
IV.2.8.- Ovocitos.	96
IV.2.9.- Ovocitos atrésicos.	97
IV.2.10.- Ovocitos inmaduros.	99
IV.2.11.- Ovocitos madurados.	100
IV.2.12.- Ovocitos maduros.	101
IV.2.13.- Ovocitos inseminados.	102
IV.2.14.- Calidad ovocitaria.	104
IV.2.15.- Medias de folículos, ovocitos y ovocitos inseminados.	105
IV.3.- Análisis de regresión logística.	106
V.- COMENTARIOS	111
V.1.- Comentarios generales.	112
V.2.- Factores en ciclos con fallos de fecundación.	116
V.2.1.- Factores en FIV.	116
V.2.2.- Factores en ICSI.	122
V.2.3.- FIV vs ICSI.	128
V.3.- Posibles soluciones al fallo de fecundación.	133
V.4.- Posibles causas de fallo de fecundación en los ciclos estudiados.	139
V.5.- Variables estudiadas sólo en el grupo de embarazadas.	141
V.6.- Variables estudiadas sólo en el grupo con fallo de fecundación.	142
V.7.- Fórmula predictiva de embarazo con cinco variables.	144
VI.- CONCLUSIONES	146
VII.- BIBLIOGRAFÍA	149
VIII.- ANEXO: Publicaciones.	162

I.- INTRODUCCIÓN

I.1.- FALLO DE FECUNDACIÓN

Es indudable que los numerosos avances realizados en el campo de la reproducción asistida en los últimos años, desde el nacimiento del primer “bebé probeta” (1), han conseguido en todo el mundo un aumento en el número de gestaciones y de “niño sano en casa”. La selección embrionaria, considerando el embrión como un “todo”, desde el día de la obtención de los gametos (día 0) hasta la transferencia (generalmente en D+2 ó D+3), desde la interpretación de los diferentes dismorfismos ovocitarios (en aquellos ovocitos previamente decumulados para microinyectarse) hasta toda una serie de nuevos parámetros (estudio en estadio de pronúcleos, presencia del halo citoplasmático, e, incluso, el ángulo que forman los dos corpúsculos polares con un eje imaginario que atraviese los dos pronúcleos y estudio de la división temprana a las 27 horas entre otros), unidos a los ya existentes: ritmo de división, multinucleación, fragmentación, etc., han logrado, no solo mantener, si no también aumentar la tasa de embarazo, disminuyendo el número de embriones a transferir y con ello el embarazo triple, que actualmente se considera un fracaso en las técnicas de reproducción asistida.

Sin embargo, y a pesar de los cambios introducidos en nuestro laboratorio de FIV (“Fecundación In Vitro”) en los últimos años, intentado su adaptación a una “clean-room”: cabinas de flujo laminar con superficie calefactada, torres “CODA”, filtros “HEPA”, sustitución de incubadores con una única portezuela por incubadores con portezuelas individuales, mejores medios de cultivo, una mayor oscuridad, permitiendo trabajar evitando los cambios bruscos de temperatura y CO₂, simulando, en la medida de lo posible, las mejores condiciones para los gametos y embriones, tratando de “pensar como un embrión”, incluso, aumentado el número de ciclos en los que se realiza la microinyección espermática (2), (ICSI, del inglés “IntraCytoplasmic Sperm Injection”) ya sea pura o mixta, aunque no haya un factor masculino severo, todos los meses no encontramos con algunos casos de los temidos fracasos o fallos de fecundación, ciclos en los que no hay embriones para transferir.

A veces las causas son claras:

.- Un factor femenino: factor etario: a partir de los 37 años se considera edad reproductiva avanzada; factor ovocitario: baja respuesta, mala calidad ovocitaria, gran proporción de ovocitos atrésicos o inmaduros en la punción; otros factores femeninos

importantes son la endometriosis (patología que incide sobre la fertilidad de forma tan importante que tiene entidad por sí sola) o el síndrome de ovario poliquístico (SOP), que podrían originar una peor calidad ovocitaria.

.- Un factor masculino: una oligo-asteno-terato-necrozoospermia severa, una criptozoospermia, una muestra de espermatozoides procedentes de biopsia testicular (TESE, del inglés: “Testicular Sperm Extraction”, “Extracción Testicular de Espermatozoides”), o una alteración genética oculta, como un FISH (Fluorescente In Situ Hybridization) alterado de espermatozoides en sémenes aparentemente normales o con un factor leve (astenozoospermias), pueden ser la causa del fracaso de fecundación.

.- Una combinación de ambos factores: femenino y masculino a la vez.

.- La utilización de una técnica inadecuada: FIV convencional en vez de ICSI en parejas que han tenido fallos anteriores de inseminación artificial, por ejemplo.

.- La posible realización de unos protocolos de trabajo no del todo correctos, un lote defectuoso de medios o el hecho de que haya obras en el mismo edificio en donde se encuentra el laboratorio de FIV (acumulación de polvo y sustancias tóxicas como pinturas), pueden ser también la causa de una bajada en las tasas de fecundación y, por tanto, de que haya más fallos de fecundación de lo normal en un tiempo determinado.

En otras ocasiones las causas no son tan claras:

.- Ciclos en los que se han conseguido un número y calidad de ovocitos suficientes, y cuya muestra seminal no es mala.

En estos ciclos hay que intentar averiguar qué ha ocurrido, quizás se trate de un crecimiento folicular irregular, una administración incorrecta de la medicación, una alteración genética de los espermatozoides que en principio estaba oculta (si queda confirmado por un FISH alterado, estudio genético realizado después del fallo de fecundación), o el denominado factor “idiopático”, es decir, de causa desconocida, o sin causa aparente.

Los fallos de fecundación podrían solventarse con un cambio de medicación, un cambio de técnica o un cambio de gameto (masculino, femenino o ambos). Los fracasos de fecundación en un ciclo no predicen nuevos fallos en ciclos posteriores, ya que se han conseguido embarazos subsiguientes sólo realizando un cambio de medicación y obteniendo mejores ovocitos. También parejas que han presentado un fallo total de fecundación han tenido embarazos anteriores. Por tanto, el fracaso en el primer tratamiento no tiene por qué disminuir las posibilidades de éxito en un intento posterior, pues las características de la cohorte de ovocitos y embriones producidos pueden ser distintas, incluso con pautas de estimulación similares: el ovario responde de forma diferente con la misma medicación. Cuando ocurren dos fallos de fecundación consecutivos se ha de pensar en el cambio de gameto.

La recepción de ovocitos es la técnica de reproducción asistida que tiene un mayor porcentaje de embarazos (3) y cabría preguntarse en muchos ciclos con ovocitos propios si realmente merece la pena seguir adelante, sobre todo cuando se obtienen pocos ovocitos y de mala calidad en más de un ciclo, o se trata de una mujer con edad reproductiva avanzada (a la que habría que añadir la alta tasa de anomalías cromosómicas existentes, terminando en aborto un alto porcentaje de gestaciones), pues en estos casos las posibilidades de éxito disminuyen drásticamente. Es un hecho en nuestra sociedad que la edad de la primera gestación se ha retrasado, y cada vez más; en la práctica clínica diaria, consultan parejas que demandan un embarazo a una edad superior a los 35 años. Es difícil para una mujer que conserva sus ciclos menstruales, que acepte un hijo que no pueda ser genéticamente propio, al menos sin haberlo intentado.

Asimismo, los ciclos con semen de donante, lejos de disminuir con la aparición de la ICSI, no quedan descartados en ciclos con factores muy severos o con alteraciones genéticas en el semen, pues calidades de sémenes normales no significa que tengan capacidad fecundante. Hay fallos de fecundación, en principio incomprensibles, que se ha visto que tienen un origen genético (4). El estudio de la fragmentación del ADN en espermatozoides, el FISH alterado o alteraciones en la meiosis nos llevan a considerar que hay un porcentaje de gametos masculinos que, aunque aparentemente sean normales, genéticamente no lo son.

Desde el punto de vista del laboratorio hay que intentar dar con una explicación, o posible explicación de por qué no ha habido embriones en este ciclo, aunque a veces encontrarla en un ciclo concreto que ha ido mal no siempre es fácil. Siempre teniendo en cuenta que cada pareja ha de recibir una solución individualizada y que no se debe generalizar, hay que procurar dar con una solución para un siguiente ciclo, que podría pasar desde un simple cambio de medicación hasta la doble recepción de gametos.

Por tanto, el éxito en un tratamiento de reproducción asistida depende de los ginecólogos y embriólogos, responsables en la inducción de la ovulación y del cuidado y manejo de los gametos y embriones, y de todo el equipo del centro (enfermeras, auxiliares, técnicos de laboratorio, etc). A todo ello debemos sumarle el papel más importante, el de la pareja, pues cualquier posibilidad de éxito de un tratamiento depende de los gametos que ellos proporcionan.

I.2.- LA FECUNDACIÓN

La fecundación es, según la Real Academia de la Lengua Española (5), la “acción y efecto de fecundar”, es decir, de “unir la célula reproductora masculina a la femenina para dar origen a un nuevo ser”.

El mecanismo de la fecundación sigue siendo actualmente uno de los fenómenos más importantes y complicados que existen en el mundo de la ciencia. El proceso natural de fecundación en el ser humano es casi desconocido, ya que de momento es imposible observar su dinámica “in vivo”: hay que basarse en los acontecimientos visualizados y descritos en los trabajos de fecundación “in vitro” (6).

Las células germinales masculinas y femeninas son elementos celulares muy especializados, tanto desde el punto de vista estructural como bioquímico. Son precisamente su complejidad y especialización las características que capacitan a estas células para realizar los fenómenos involucrados en la fecundación.

Aún no se conoce del todo la constitución bioquímica de los gametos, de lo que se deduce la ignorancia en muchos mecanismos que operan en la fecundación y la dificultad para interpretar, desde el punto de vista biológico y clínico, los casos de

parejas incapaces de concebir hijos. La consecuencia es la denominada “causa inaparente” o “esterilidad idiopática” en más de una pareja estéril.

Sin embargo, en los últimos tiempos se han realizado avances significativos en el conocimiento sobre la biología de los gametos y de la fecundación. Estos nuevos conocimientos han permitido el desarrollo de nuevos métodos de exploración y diagnóstico y de nuevos enfoques terapéuticos. La clínica de la reproducción ha logrado soluciones inimaginables hace unos años y seguramente enormes avances nos sorprenderán en el futuro (7).

Los ovocitos y los espermatozoides deben haber completado normalmente todas sus etapas de maduración antes de ponerse en contacto para que la fecundación se lleve a cabo con éxito (8), mediante la ovogénesis y la espermatogénesis respectivamente. El ovocito completa su maduración en el ovario, dentro del folículo. Los ovocitos maduros extraídos de los folículos para fecundación “in vitro” aparecen como un complejo cúmulo-ovocito (CCO) que muestra al ovocito en la etapa de metafase de la segunda división meiótica (metafase II) con la visualización del primer corpúsculo polar entre la membrana vitelina y la zona pelúcida. El cúmulo tiene sus células débilmente unidas entre sí y radialmente expandidas, presentando una zona más densa llamada “corona” alrededor de la zona pelúcida.

La fecundación está integrada por numerosos eventos encadenados que se cumplen según una secuencia temporal precisa. Dicha complejidad biológica repercute bastante en el campo médico pues cuanto más complicado sea un hecho más probable es que se puedan producir errores, con la consecuente alteración en la estructura o en la fecundación, lo que se traduce en una situación patológica. La fecundación “in vivo” se produce en la ampolla o región ampular de la trompa de Falopio, y podría dividirse en una serie de pasos fundamentales: el transporte de gametos, la capacitación espermática, la unión del espermatozoide a la zona pelúcida del ovocito, la reacción acrosomal, la fusión espermatozoide-ovocito y la activación ovocitaria.

En condiciones naturales o tras realizar una FIV convencional, el espermatozoide capacitado atraviesa las células del cúmulo-corona y se une a la zona pelúcida (ZP) del ovocito. Esta unión desencadena la liberación del contenido del

acrosoma del espermatozoide (reacción acrosómica), permitiendo que atravesase la ZP y se produzca la fusión con la membrana del ovocito (9). Los espermatozoides deben estar parcialmente capacitados y no reaccionados (acrosoma intacto) para poder atravesar las células del cúmulo. Se sabe que sólo los capacitados se mueven libremente dentro de la matriz del cúmulo, mientras que los no capacitados se unen a la superficie pero no pueden atravesarla (10).

La fusión entre ambas membranas provoca la activación del ovocito, lo que pone en marcha una serie de sucesos bioquímicos y físicos que dan lugar, por un lado, a la extrusión del segundo corpúsculo polar (CP) y la formación del pronúcleo (PN) femenino y, por otro, a la descondensación de la cabeza del espermatozoide y la posterior formación del PN masculino. Sólo la presencia de dos pronúcleos y dos corpúsculos polares a las 16-20 horas después de la inseminación asegura que se ha producido la fecundación correcta.

Los fallos en la formación de los PN surgen de defectos específicos en cualquiera de los gametos después de la penetración del espermatozoide, especialmente de la capacidad de organización de los microtúbulos por parte del centrosoma del gameto masculino, del crecimiento de los microtúbulos astrales del espermatozoide responsable de la colocación del genoma y del desarrollo durante el primer ciclo celular. Disfunciones semejantes en la fecundación se han observado en los fallos de ICSI. También se han encontrado fallos de fecundación debidos a la no extrusión del segundo corpúsculo polar, a la activación ovocitaria sin activación del espermatozoide o a la existencia de deleciones en el ADN mitocondrial de ovocitos no fecundados (11).

Posteriormente, y a través de una cascada de sucesos moleculares, algunos de los cuales llegan a expresarse de manera estructural, se culmina en un aumento de las actividades biosintéticas, síntesis de ADN, de proteínas y, por último, la división celular y el inicio de la segmentación.

I.3.- APROXIMACIÓN A SOLUCIONES EN EL FALLO DE FECUNDACIÓN

El fallo de fecundación tras el proceso de FIV convencional o microinyección espermática (ICSI), es un fenómeno que ocurre entre aproximadamente un 11 y un 15%

de los ciclos de FIV convencional y en un 3% tras ICSI (12). La reinseminación de estos ovocitos, sin signo de fecundación se propone como alternativa ante un fallo de fecundación, encontrando en la literatura tasas de fecundación por FIV que rondan el 36% y tasa de fecundación por ICSI entre el 60-70% (13).

Sin embargo, estos buenos resultados van acompañados de un alto grado de polispermia en los ovocitos reinseminados, de embriones con pobre calidad y nulo potencial de implantación (14, 15). Por tanto, y a pesar de que nuestro equipo consiguió un embarazo a término no hace mucho tiempo (16), haciendo ICSI al día siguiente de todos los ovocitos no fecundados previa inseminación con FIV, y de que hay otros estudios con nacimiento de niños sanos (17, 18), actualmente pocos grupos utilizan este procedimiento.

En caso de encontrar parejas con una esterilidad sin causa (de causa desconocida o idiopática) y un ciclo previo sin fecundación o menos del 20% de ovocitos fecundados, algunos autores recomiendan la realización de otro ciclo de FIV convencional, ya que el fallo completo de fecundación en un primer ciclo no necesariamente debe persistir en el siguiente (19), por tratarse de causas ciclo específicas no repetibles (cohorte de ovocitos, condiciones de cultivo, etc.) habiéndose obtenido con este protocolo tasas de fecundación del 44% (20).

También se ha propuesto realizar un ciclo de FIV utilizando una mayor concentración espermática en la inseminación (21, 22) obteniéndose tasas de fecundación de alrededor del 36%. Sin embargo, esta práctica no es recomendada como solución para tratar de forzar la fecundación (23, 24), ya que se pueden acumular en el medio de cultivo metabolitos tóxicos o una elevada concentración de ROS (“especies reactivas de oxígeno”: “Reactive Oxygen Species”), que pueden interferir en el proceso de fecundación y posterior desarrollo embrionario (25).

Por otra parte, ante un fallo de FIV convencional, algunos autores (26, 27) han realizado un estudio sobre la incidencia de anormalidades en ovocitos, relacionando las aberraciones cromosómicas maternas con la reducción de la tasa de fecundación (28), proponiendo en estos casos la donación de ovocitos.

Por último, en distintos trabajos (29, 30) encontramos que la mejor opción es la realización de un ciclo de ICSI, pues la práctica de un nuevo ciclo de FIV convencional resulta en tasas de fecundación no superiores al 20% (23), y la realización de una ICSI, en este grupo de pacientes, reduce considerablemente el riesgo de un nuevo fallo de fecundación, permitiendo obtener tasas de fecundación superiores al 70% (13). En casos de fallos de fecundación de ICSI por factor masculino severo se podría intentar un nuevo ciclo, pero si el fallo persiste cabe la posibilidad de hacer un próximo ciclo con semen de donante.

Las mayores tasas de fecundación tras un fallo en un ciclo de FIV se consiguen en un segundo de ICSI. Algunos autores (23) consideran que en caso de tener un número suficiente de ovocitos, debería realizarse un ciclo mixto, en donde los ovocitos con un estadio de inmadurez mayor se inseminarían con FIV convencional, siempre y cuando los parámetros seminales de número, motilidad y morfología lo permitan; los ovocitos maduros se inyectarían tras decumulado previo: se inyecta el ovocito sin la capa de células del cúmulo que lo rodean. En una FIV convencional, por el contrario, se insemina todo el complejo cúmulo-corona-ovocito (CCCO).

Posiblemente la mayoría de los fallos en FIV sean debidos al gameto masculino (31), quedando demostrado en la actualidad que hasta en la cuarta parte de los pacientes con esterilidad de origen desconocido puede haber un defecto en la interacción espermatozoide-ZP, que da lugar a un fallo de fecundación (32, 33). En muchos casos se han observado pocos o ningún espermatozoide adherido a la ZP, pues ciertos defectos en la misma podrían afectar a la reacción acrosómica (34), impidiendo la penetración del espermatozoide.

La ICSI es una técnica que se está imponiendo en todo el mundo, y aunque su realización en un primer ciclo (mixta, si el semen está bien), evita el fracaso de FIV convencional, no evita, sin embargo, al 100% un fracaso de inseminación, ya sea por escaso número de ovocitos o por alguna causa genética subyacente o de otra índole.

Las causas más frecuentes de los fallos de fecundación tras la inyección intracitoplásmica del espermatozoide son los posibles problemas en la activación ovocitaria. Además de ser un inconveniente para la fecundación, algunas anomalías de

la activación ovocitaria pueden manifestarse posteriormente durante el desarrollo embrionario. Es posible que el ligero aumento de las anomalías cromosómicas tras la ICSI esté relacionado con una forma atípica de activación ovocitaria, propia de dicha técnica de reproducción asistida (6). La investigación debe continuar para poder obtener una mejor activación del ovocito, bien mediante una perfecta selección espermática que pueda asegurar dicha activación, bien mejorando la misma técnica de microinyección espermática en el gameto femenino. Así conseguiremos unos mayores índices de fecundación, una mayor calidad embrionaria y, por tanto, un mayor número de embarazos.

En un estudio realizado con 2.732 ciclos de ICSI (35) se encontró que en un total de 76 ciclos (72 parejas) se había producido un fallo total de fecundación (3%). De las 72 parejas, 26 realizaron un nuevo ciclo de ICSI consiguiendo fecundación en 22, y tan solo 4 parejas volvieron a no tener ovocitos fecundados, pues 3 tenían un diagnóstico de globozoospermia (tipo de teratozoospermia, en donde la cabeza del espermatozoide es totalmente redonda y carece de acrosoma) y una se catalogó como fallo idiopático. El estudio concluía que la mayoría de las parejas con un fallo total de fecundación en un ciclo de ICSI podrían alcanzar fecundación en subsiguientes ciclos, también de ICSI, y con los mismos gametos.

Independientemente de la alternativa que se haya tomado para el siguiente ciclo tras un fallo de fecundación, se debe tener en cuenta varios puntos: actitud ante pobres o bajas respuestas, factor masculino y factor de laboratorio (36).

Un punto importante a la hora de considerar un fallo de FIV es el número de ovocitos fecundados, ya que se podría pensar que el fallo se produce por tener muy pocos ovocitos, por lo que la realización de una ICSI hubiese sido lo mejor para asegurarnos la fecundación. Sin embargo, son numerosos los trabajos (37, 38) que demuestran que la tasa de gestación en ciclos en donde se obtienen menos de 3 ovocitos es igual si se realiza tanto una FIV como una ICSI.

Es trascendental la decisión de cancelar o no un ciclo con baja respuesta (número de folículos de buen tamaño igual o inferior a 5), pues un número importante de ellos podrían contarse como futuros fracasos de inseminación. En diversos trabajos

(36, 38, 39) deciden, ante una pobre respuesta, continuar con el ciclo de FIV como la mejor opción antes de cancelar. Los resultados de estos estudios indicarían que pacientes menores de 40 años deben seguir con el ciclo de FIV a pesar del pobre reclutamiento folicular. En pacientes mayores la relación edad-pobre calidad ovocitaria, compromete el éxito del tratamiento, por tanto la cancelación del ciclo sería la actuación más apropiada, y la donación de ovocitos para ellas una buena solución.

Con respecto al factor masculino, el espermatozoide que se microinyecte debe poseer una cromatina capaz de descondensarse en el momento que entra en contacto con el núcleo del ovocito. Aunque se ha comprobado que no es necesaria la maduración del gameto masculino en el epidídimo para que se complete la maduración nuclear (40), numerosos grupos han demostrado que pacientes con infertilidad de origen masculino poseen anomalías ocultas en el núcleo espermático, que se traducen en un mayor nivel de empaquetamiento de la cromatina y daño del ADN (41).

También existen trabajos que prueban la importancia del centrosoma para el éxito de la fertilización, demostrándose que determinados fallos de fecundación pueden estar asociados a anomalías en el mismo, como fallos del espermatozoide para nuclear los microtúbulos después de la incorporación espermática, fallo en la elongación de los microtúbulos después de la formación del áster, o la separación del centrosoma de la cabeza espermática (42). Por tanto, los defectos del centrosoma son una nueva causa de fallo de fecundación que no se resuelve por ICSI.

Los varones con una mala calidad espermática se hayan más expuestos a ser portadores de una mutación de la fibrosis quística o de una delección de los brazos largos del cromosoma Y. Por esta razón, los pacientes seleccionados para ICSI por factor masculino severo, deben ser especialmente estudiados, pareciendo muy razonable el ofrecer a toda pareja embarazada por ICSI la posibilidad de llevar a cabo un diagnóstico prenatal mediante amniocentesis (4).

Un seminograma normal en sus parámetros básicos de número, motilidad y morfología espermática tiene una alta correlación con la fertilidad, pero se ha de resaltar que un semen “normal” y un semen “fértil” no son sinónimos. La normozoospermia no asegura en un 100% que la dotación genética de los espermatozoides sea normal.

Un semen “normal” según los parámetros puede presentar alteraciones no detectadas en el seminograma convencional y carecer de capacidad para fecundar a un ovocito y dar lugar al nacimiento de un niño sano. A su vez un semen “anormal”, es decir, con los parámetros espermáticos en el límite o por debajo de la normalidad, puede producir gestación (43). Por tanto, se podría decir que un seminograma es bastante limitado en cuanto a las posibilidades diagnósticas reales y finales que ofrece, y aún así, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se trata de una prueba imprescindible, ya que descarta de entrada infertilidades claras. El problema se origina cuando se da por normal un eyaculado que tiene enmascarado cualquier defecto de función espermática (44), siendo la donación de semen una posible solución.

Por último, son diferentes los aspectos del laboratorio que hay que considerar ante un fallo de fecundación, como el control de CO₂, los niveles de compuestos orgánicos volátiles, la instalación de filtros de aire, la existencia de algún tipo de contaminación por algún agente patógeno, etc. Resulta crucial para cualquier programa de fecundación “in vitro” que la incubadora de CO₂ esté correctamente regulada y calibrada, ya que distintas concentraciones alterarían de forma importante el pH, con el consiguiente efecto deletéreo para el material biológico.

Se ha comenzado a dar importancia a los factores ambientales y microambientales y su posible influencia sobre ovocitos y embriones. Durante su cultivo “in vitro”, gametos y embriones se ven expuestos a una serie de situaciones artificiales, como son los cambios de temperatura y de luz o la presión de O₂ y CO₂, que pueden llegar a afectarlos (45); por otro lado, también se exponen a sustancias con las que difícilmente llegarían a entrar en contacto de forma natural y que pueden afectar al desarrollo embrionario (46).

Todas estas nuevas situaciones a las que embriones y gametos se van a ver expuestos pueden mitigarse en gran medida por la conversión de los laboratorios de FIV en “cleanrooms” o “habitaciones blancas”. Esta conversión del laboratorio de FIV en “cleanroom” no sólo va a facilitar el control de la calidad del aire, es decir, la concentración de partículas de un tamaño determinado y la presencia de compuestos orgánicos volátiles, sino que también va a conseguir unas condiciones estables de temperatura y humedad (47).

La limpieza del aire dentro del laboratorio de FIV va a depender no sólo del filtrado exterior, sino también del laboratorio en sí. El número de personas y su indumentaria será importante para controlar este parámetro. Por esta razón, el uso de mascarilla, gorro y calzado adecuados resultará imprescindible. También se pueden utilizar otro tipo de medidas paliativas, como dejar siempre encendidas las campanas de flujo laminar, para que actúen como unidades eliminadoras de partículas en el ambiente, cambiar los medios de cultivo de gametos/embriones e instalar unidades CODA en puntos estratégicos.

También hay que tener en cuenta que el éxito del cultivo de gametos y embriones humanos y de la gestación en los programas de Fecundación “In Vitro” necesita de unas buenas prácticas de laboratorio. Por ello la puesta en marcha de controles de calidad en los laboratorios de embriología clínica puede ser muy importante para evitar, en la medida de lo posible, estas variaciones indeseadas en los resultados clínicos, y, en el caso de que éstas se produzcan, tratar de que sean más fácilmente detectables (47).

Debe existir un manual de protocolos que describa de forma pormenorizada y detallada todos los procesos que se realicen en el laboratorio. Cada embriólogo será comparado con las medias generales del laboratorio, para corregir los malos hábitos que pueden desencadenar resultados no deseados. Por tanto se recomiendan los controles de calidad internos destinados a homogeneizar dichas procedimientos y contar con guías que cubran aspectos como la organización, equipamiento, destrezas, personal técnico y seguridad, es decir, todo lo necesario para una buena práctica de laboratorio.

II.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Nuestra hipótesis inicial de trabajo afirma que los factores femenino, masculino, de laboratorio e idiopático pueden tener relación con los fallos de fecundación en pacientes estériles que se sometieron a ciclos de FIV ó ICSI, por lo que nos planteamos los siguientes objetivos específicos del estudio:

1. Determinar la influencia del **factor femenino** medido mediante la edad, reserva ovárica, respuesta ovárica a la estimulación, calidad ovocitaria y endometriosis en la consecución de embarazo en parejas estériles que realizan ciclos de FIV ó ICSI y que han presentado un fallo de fecundación.
2. Determinar la influencia del **factor masculino**, considerando la severidad, biopsia testicular y factor genético en la consecución de embarazo en parejas estériles que realizan ciclos de FIV ó ICSI y que han presentado un fallo de fecundación.
3. Determinar la influencia del **factor de laboratorio**, evaluando las técnicas inadecuadas y los medios en la consecución de embarazo en parejas estériles que realizan ciclos de FIV ó ICSI y que han presentado un fallo de fecundación.
4. Determinar la influencia del **factor idiopático** o sin causa aparente en la consecución de embarazo en parejas estériles que realizan ciclos de FIV ó ICSI y que han presentado un fallo de fecundación.

III.- MATERIAL Y MÉTODO

III.1.- DISEÑO

Se ha realizado un estudio clínico retrospectivo no randomizado, en el que se revisaron las historias clínicas de todas las parejas, que acudieron a consulta por esterilidad o infertilidad y realizaron ciclos de fecundación “in vitro” convencional, microinyección espermática, TESE+ICSI (espermatozoides procedentes de biopsia testicular más microinyección espermática) y técnica mixta (mitad convencional y mitad microinyección) y que han presentado un fallo de fecundación, durante un periodo de 33 meses, desde Octubre de 2.004 a Junio de 2.007, en la clínica GINEFIV de Madrid..

III.2.- SUJETOS

Se estudiaron un total de 206 ciclos, en donde no se contabilizan parejas receptoras de ovocitos ni de semen de donante, y se compararon con otro grupo, compuesto por 400 parejas que consiguieron embarazo con sus propios gametos, con el diagnóstico de latido cardíaco fetal (LCF), confirmado por ecografía en la sexta semana de gestación.

Las variables analizadas se recogieron mediante la historia clínica de las parejas, en las que se contemplaban los siguientes datos: datos personales, datos de la mujer, datos del varón, estudio y diagnóstico y tratamiento:

III.2.1.- Datos Personales

- .- Fecha de nacimiento de la mujer y del varón.
- .- D.N.I. de ambos.
- .- Profesiones.
- .- Grupo sanguíneo y Rh.
- .- Nacionalidad, raza y estado civil.
- .- Teléfonos y dirección.

III.2.2.- Datos de la mujer

A.- Antecedentes:

- .- Contacto con: Alcohol, drogas, tabaco (cigarros/día) y tóxicos.
- .- Antecedentes familiares a destacar.
- .- Médicos: Pérdida de conocimiento, convulsiones, transfusiones, alergias.
- .- Quirúrgicos.
- .- Ginecológicos: Menarquia o edad de la primera regla, tipo menstrual, menopausia, toma de anticonceptivos, síntomas (dismenorrea, coitalgia, leucorrea, metrorragia, etc), patología de mamas y antecedentes de gestaciones, partos, abortos, ectópicos y nacidos vivos.

B.- Exploración General:

- .- Talla y Peso: IMC (Índice de Masa Corporal): normosómica, pícnica, asténica o atlética.
- .- Acné, tiroides e hirsutismo.
- .- Fenotipo: color del pelo y de los ojos.

C.- Exploración Ginecológica:

- .- Ecografía basal: número de folículos antrales en cada ovario.
- .- Posibles patologías de: Genitales externos, vagina, ovario izquierdo y derecho, cuello y útero.

D.- Exploraciones Especiales:

- .- Hematología y bioquímica completas, citología y colposcopia.
- .- Serología para HCV (hepatitis C), HBV (hepatitis B) y HIV (SIDA); toxoplasmosis, rubéola y lúes (sífilis).
- .- Fecha de revisión.

III.2.3.- Datos del varón

- .- Antecedentes de contacto con alcohol, drogas, tabaco (cigarros/día) y tóxicos.
- .- Stress y dificultades en la obtención de la muestra.
- .- Antecedentes familiares a destacar.
- .- Antecedentes médicos y quirúrgicos. Alergias.

- Antecedentes genito-urinarias: enfermedades venéreas.
- Hemograma completo.
- Fenotipo: Color del pelo y color de ojos.
- Serología para HCV (hepatitis C), HBV (hepatitis B) y HIV (SIDA). Lúes (sífilis).

III.2.4.- Estudio

A.- Estudio y tratamientos previos, transfer de prueba y observaciones de transfer.

B.- Factor masculino:

- FSH, LH, PRL, Testosterona, cultivo.
- Seminograma y TSE (Test de Supervivencia Espermática o REM: Recuento de Espermatozoides Móviles). El varón completa una ficha que le será entregada a la recepción de la muestra (figura 1).

Ginefiv
Estudio de la Esterilidad
Fertilización "In Vitro"

Nº Historia: _____ Fecha: _____ Sociedad Médica: _____ Pago: ☐ Sí ☐ No
 Prueba Solicitada: _____ Doctor/a que lo solicita: _____

Varón: _____ NIF: _____ Fecha de nacimiento: ____/____/____
 Pareja: _____ NIF: _____ Fecha de nacimiento: ____/____/____
 Teléfono de contacto: _____ Dirección: _____
 Código Postal: _____ Población: _____ Provincia: _____

Anamnesis del Paciente

¿Se ha realizado ya un análisis de semen? ☐ Sí ☐ No En caso afirmativo ¿Lo ha realizado en Ginefiv? ☐ Sí ☐ No
 ¿Ha acudido alguna vez al urólogo? ☐ Sí ☐ No
 ¿Tiene actualmente hijos? ☐ Sí ☐ No ¿Cuánto tiempo llevan intentado tener hijos? _____ ¿Algún aborto? ☐ Sí ☐ No
 ¿Está tomando alguna medicación? ☐ Sí ☐ No ¿Cuál? _____
 ¿Ha tenido ... alguna enfermedad infecciosa? ☐ Sí ☐ No ¿Cuál? _____
 ... alguna infección genital? ☐ Sí ☐ No ¿Cuál? _____
 ... alguna molestia al orinar o eyacular? ☐ Sí ☐ No
 ... fiebre en las últimas dos semanas? ☐ Sí ☐ No
 ... stress recientemente? ☐ Sí ☐ No
 ... contacto con tóxicos? (prod. químicos, radiaciones, drogas...) ☐ Sí ☐ No
 ¿Bebe alcohol habitualmente? ☐ Sí ☐ No ¿Fuma? ☐ Sí ☐ No ¿Cuánto? _____ Cigarros / día
 ¿A su mujer le han detectado alguna patología ginecológica? ☐ Sí ☐ No ¿Cuál? _____
 ¿Está en tratamiento de FIV o Inseminación? ☐ Sí ☐ No ¿Ha estado alguna vez? ☐ Sí ☐ No ¿cuál? _____

Condiciones de la muestra de Semen

Periodo sin eyacular: _____ días
 ¿Ha sido completa? ☐ Sí ☐ No
 ¿Ha tenido dificultades para su obtención? ☐ Sí ☐ No
 ¿Hace cuanto tiempo que la obtuvo? _____ minutos

Declaro que todos los datos y la muestra entregada corresponden con el varón arriba indicado

Firma del Paciente _____

Figura 1: Ficha del varón para pruebas de semen. Clínica Ginefiv.

.- Congelación espermática, si fuera necesaria, debido a: posibles problemas en la obtención de la muestra el mismo día de la FIV, ya sea por nervios o por el tipo de profesión del varón, al encontrarse muy a menudo de viaje; por mala calidad espermática; por tratamiento de quimioterapia, etc.

.- Estudio andrológico, si fuera necesario, por diagnóstico de azoospermia secretora u obstructiva, varicocele, vasectomía (se requiere una biopsia testicular o TESE para la recuperación de espermatozoides viables), mala calidad espermática o problemas derivados de la obtención de la muestra, como una aneyaculación o una eyaculación retrógrada (se han de recuperar los espermatozoides de la orina).

.- Cariotipo en sangre periférica en semen diagnosticado para ICSI por calidad seminal alterada y en los donantes de semen (para los ciclos en los que se vaya a utilizar estas muestras).

En cuanto a la valoración del semen o seminograma, se utilizaron los parámetros de normalidad de la OMS-97 (Organización Mundial de la Salud), siendo los tres más importantes el número, la motilidad y la morfología.

.- El número o concentración de espermatozoides ha de ser mayor o igual a 20 millones por mililitro.

.- La motilidad puede presentar 4 tipos básicos:

.- Tipo “a” (+++): Movimiento rectilíneo y rápido.

.- Tipo “b” (++) : Movimiento no rectilíneo o en “zig-zag” y rápido. También puede ser rectilíneo y lento, o en “zig-zag” y lento.

.- Tipo “c” (+): Movimiento “in situ”, sin avance.

.- Tipo “d”: Inmóviles.

Un movimiento normal ha de presentar, al menos el 50% de espermatozoides tipo “a” (+++) y tipo “b” (++) , o al menos el 25% o más de gametos móviles tipo “a” (+++), es decir, con un movimiento recto y rápido. Ha de haber un 75% ó más de espermatozoides vivos.

.- La morfología ha de contar con al menos un 30% ó más de formas normales, haciendo especial hincapié en la morfología de la cabeza (macrocéfalos, microcéfalos, amorfas, alargadas, redondas o dobles cabezas); del segmento intermedio (anguloso, con gota citoplasmática o engrosado); y de la cola (enrollada, corta o doble cola).

Otros parámetros secundarios en la valoración del semen podrían ser:

- .- El volumen del eyaculado, entre 2 ml y 6 ml.
- .- El pH seminal, comprendido entre 7,2 y 8,0.
- .- La concentración de leucocitos, que ha de ser menor de 1 millón por ml, es decir, se han de ver menos de 10 leucocitos por campo en un microscopio a 40x.
- .- Viscosidad, suciedad, aglutinación y células de descamación: Cuanto mayores sean, peor pronóstico, pues el semen se “capacitará” peor.

El diagnóstico de una muestra seminal se refiere, pues, a los tres parámetros fundamentales: número, motilidad y morfología, a los que se añade el volumen y la mayor presencia de leucocitos (figura 2):

- .- Hipospermia: Menos de 2 ml de volumen total del eyaculado.
- .- Hiperespermia: Más de 6 ml de volumen total del eyaculado.
- .- Azoospermia: Ausencia de espermatozoides en el eyaculado.
- .- Oligozoospermia (O): Menos de 20 millones de espermatozoides por ml.
- .- Astenozoospermia (A): Menos del 50% de formas “a” (+++) y “b” (++)
También menos del 25% de formas “a” (+++).
- .- Teratozoospermia (T): Menos del 30% de formas normales.
- .- Necrozoospermia (N): Porcentaje igual o mayor al 50% de formas inmóviles.
- .- Leucospermia: Más de 1 millón de leucocitos por ml de eyaculado.
- .- Criptozoospermia: Ausencia de espermatozoides en el eyaculado. Sólo aparecen tras centrifugación de la muestra. También se puede denominar: Oligo-Asteno-Terato-Necrozoospermia severa.

SEMINOGRAMA					Test de Supervivencia Espermática				
Vol (ml):					Viscosidad:				
Conc., (esp./ml):					Conc., (esp./ml):				
Motil: BIEN REG MALA INMOV					Motil: BIEN REG MALA INMOV				
Avance:					Velocidad:				
Morfología:					Morfología:				
Leucocitos (leuco/campo):					Leucocitos (leuco/campo):				
Contaminación 24h:					Contaminación 24h:				
pH:					pH:				
Agglutinación:					Agglutinación:				
Cel. Descamación:					Cel. Descamación:				
Norm	Labeza	SI	Cola	Pinta					
Anorm	Mac	Ang	Enr						
	Mic	GC	Cort						
	Amorf	Engr	D.col						
	Alarg								
	Red								
	D.cab								
Observaciones:					REM 2 Horas (Conc. esp/ml):				
					REM 24 Horas Motil: BIEN REG MALA				
					IAH FIV ICS				
					FECHA				
					FILA GOTA				
Cultivo:					Congelación Vol. (ml):				
Resultado:					MD:				
					Técnica:				
					Motivo:				

Figura 2: Datos del semen para seminograma, TSE y congelación.

Además del seminograma se realiza una prueba de capacitación espermática, el TSE o Test de Supervivencia Espermática, en donde, junto a los datos básicos del semen, se incluyen los resultados de dicha capacitación, que sería idéntica a la que se realizaría a la pareja el día del ciclo. Los resultados mostrarían un semen apto o no apto para cada una de las técnicas de reproducción asistida: inseminación homóloga o conyugal (IAH) fecundación “in vitro” convencional (FIV) o fecundación “in vitro” con microinyección espermática (ICSI).

Se valora la motilidad espermática a las 24 horas y si no hubiera en el semen capacitado, la muestra sólo sería apta para la microinyección, descartando la fecundación “in vitro” convencional y evitando, así, un posible fracaso de fecundación.

También es importante observar la posible presencia de contaminación bacteriana a las 24 horas, tanto en el semen “en fresco” como en el capacitado (semen en un medio de cultivo y en una estufa o incubador, a 37°C y 5% de CO₂), pues ante muestras capacitadas contaminadas, al paciente hay que indicarle la toma de una monodosis de antibiótico, concretamente la azitromicina (Vinzam[®], Almirall Prodesfarma); se ha de realizar un cultivo seminal y un antibiograma si procede, además de repetirse el TSE al cabo de unos días para ver el efecto del antibiótico, que, según protocolo de trabajo de la clínica Ginefiv (2000-2010) es tomado por todos los pacientes sometidos a un ciclo de fecundación “in vitro”.

C.- Factor Vulva-vaginal-cervical:

.- Cultivos, Chlamydias, Micoplasmas, acidez del moco, insler del moco (valoración), y test postcoital.

D.- Factor Uterino-tubárico-peritoneal:

.- Ecografía en la primera consulta con un equipo Aloka SSD-1700 (figura 3), con sonda transvaginal de 5 MHz con el fin de detectar posibles alteraciones en útero y ovarios. La ecografía diagnóstica de la primera visita pretende demostrar la existencia o no del útero, su posición y dimensiones en los tres planos del espacio y la presencia o no de patología uterina, tanto en cavidad (pólipos, miomas), como en miometrio (miomas). También se demuestra la existencia, dimensiones y patología (ovarios multifoliculares, formaciones funcionales, quistes ováricos, etc) de ambos ovarios.



Figura 3: Ecógrafo Aloka SSD-1700, con sonda transvaginal

E.- Factor Endocrino:

.- Analítica hormonal basal de: FSH (Hormona folículo estimulante), LH (hormona luteinizante), PRL (prolactina), 17β -estradiol y tiroxina (T4) durante los primeros días del ciclo (2º al 5º). Se trata de la RIA (“Radio Inmuno Análisis”).

.- Niveles en sangre periférica de progesterona en la mitad de la segunda fase del ciclo (días 22-25).

F.- Factor Genético:

.- Cariotipo en sangre periférica a pacientes con abortos de repetición, o con antecedentes genéticos destacables.

G.- Factor Emocional:

.- Grado de ansiedad percibido por el ginecólogo (muy alto, alto, regular y ninguno) y apoyo emocional (no recomendado, recomendado e imprescindible).

H.- Historia sexual:

.- Frecuencia del coito, eyaculación, problemas y consanguineidad.

III.2.5.- Diagnóstico y Tratamiento

A.- Diagnóstico:

.- Tipo de esterilidad o infertilidad por la que consultaban (primaria o secundaria) y años.

.- Indicación: Femenina (40% del total aproximadamente); masculina (40%, en la actualidad y 20% hace sólo unos años); mixta (femenina y masculina); idiopática (sin causa aparente, junto a la indicación mixta supone el 20% restante).

.- Indicación femenina: Tubárica, hidrosálpinx, endometriosis, ovárica, etaria, uterina, menopausia precoz, síndrome de ovarios poliquísticos (SOP), cervical, hiperandrogenismo, anovulación, FSH alterada, hiperprolactinemia, inmunológica, genética, abortadora de repetición, vaginismo, tiroidismo, otras.

.- Grado de endometriosis: De I a IV y localización: ovárica, peritoneal, útero, otra.

.- Indicación masculina: O, A, T, N, Cripto, vasectomía, serología, genética, azoospermia secretora, azoospermia obstructiva, impotencia y otras (eyaculación retrógrada).

.- Pronóstico: Bueno, regular o malo.

B.- Tratamiento:

.- Tratamiento propuesto: Fecundación “in vitro” convencional (FIV), microinyección espermática (ICSI), mixta (mitad FIV y mitad ICSI), TESE+ICSI (espermatozoides procedentes de biopsia testicular, del inglés “Testicular Sperm Extraction”).

.- Tratamiento del laboratorio, o variantes: Normal, con hatching asistido, con cultivo largo, con lavado seminal por PCR para HIV, HPB ó HPC, etc.

.- Consentimiento informado: Entregado y firmado.

.- Número máximo de embriones a transferir.

.- Deseo o no de congelar embriones.

.- Tratamientos previos de ciclos anteriores.

En un estudio de esterilidad se debe de investigar a los dos miembros de la pareja a la vez, pues a veces ocurre que durante el estudio se descubren patologías de las que la esterilidad es sólo una de sus manifestaciones clínicas, como las endocrinopatías, tumores, endometriosis, alteraciones cromosómicas, etc. Por tanto, aunque la posibilidad de conseguir un embarazo es el principal objetivo del estudio, no es el único beneficio que de él se puede obtener.

Existen tres parámetros diagnósticos de primera categoría, según la Medicina Basada en la Evidencia (48), por tener establecida una alta correlación con la posibilidad de conseguir un embarazo:

1.- Confirmar la presencia de una proporción suficiente de espermatozoides morfológica y funcionalmente normales. De no ajustarse el resultado a los valores de referencia, se recomienda un segundo seminograma con TSE al cabo de 10-12 semanas, salvo que la alteración sugiera severidad (Azoospermia u OATN), en cuyo caso se solicitará una segunda muestra tan pronto como sea posible.

El objetivo del TSE, REM o Test de capacitación espermática es identificar el número real de espermatozoides con mejor movilidad, una vez desechados el plasma seminal, los gametos inmóviles y las células inmaduras y detritus que pudiera haber en la muestra. La técnica de reproducción asistida (TRA) indicada dependerá del resultado del número de espermatozoides recuperados y de la morfología. Por ejemplo, para la IAH harán falta al menos 5 millones de espermatozoides con buena morfología y para la ICSI unos cuantos y muestras con mala morfología, aunque el número sea suficiente. Muestras con un número de gametos recuperados de entre 2-3 millones y cinco se podrían considerar aptas para FIV, siempre y cuando la morfología fuera buena.

2.- Confirmar la existencia de Ovulación. Una mujer que tiene menstruaciones cada 26-36 días ovula regularmente, salvo ocasiones excepcionales (49). La determinación de progesterona plasmática en mitad de la fase lútea (día 20-22 del ciclo), aunque no existe un método de certeza para la valoración de la ovulación, es el que presenta una relación coste-eficacia superior.

3.- Confirmar la integridad anatómica de las trompas, mediante una histerosalpingografía (HSG), que es el método de elección y el que mejor relación coste-eficacia ofrece. Se debe realizar de 2 a 5 días después del final de la menstruación y consiste en la visualización fluoroscópica y radiográfica de la cavidad uterina y de la luz de las trompas de Falopio, tras la inyección de un contraste opaco a través de cérvix. Al tratarse de una técnica invasiva, no es recomendable en parejas que ya vienen indicadas para la realización de un ciclo de FIV.

Así pues el estudio diagnóstico inicial es realizado a cada una de las mujeres que llegan a nuestra clínica. El test post coital se podría realizar en parejas jóvenes y con poco tiempo de esterilidad, pudiendo descartar un posible factor cervical. También cabría la posibilidad de hacer otras pruebas diagnósticas si se considerara necesario, como una laparoscopia, una histeroscopia o una biopsia de endometrio.

Si todos los parámetros son normales, incluyendo la calidad seminal y la edad de la paciente no superior a los 38 años, se podría comenzar con la inseminación artificial, recomendándose un máximo de 3 a 6 ciclos. Si una vez realizadas no ha habido embarazo, se aconseja comenzar con un primer ciclo de fecundación “in vitro”, ya sea convencional, con microinyección, o mixta, que sería lo más aconsejable.

Por tanto, el estudio básico de esterilidad realizado en nuestro centro, debe fundamentarse en una estrategia diagnóstica simplificada, basada en investigaciones contrastadas. Todo ello redundará en la reducción significativa de los costes y del tiempo que van del diagnóstico a la consecución del embarazo, ya que los tratamientos de reproducción son cada vez más eficaces.

III.3.- METODOLOGÍA

Todo ciclo de fecundación “in vitro” consta de las siguientes fases: estimulación ovárica, inducción de la ovulación, punción folicular, obtención de la muestra (fresca, criopreservada, a partir de una biopsia testicular, etc.), capacitación espermática, fecundación (inseminación o microinyección), valoración de la fecundación, selección embrionaria (27 horas, D+2, D+3), transferencia embrionaria, apoyo de fase lútea y

diagnóstico de embarazo. El ciclo se puede cancelar en cada fase, ya sea por una mala respuesta a la estimulación, por punción con ovocitos no válidos (atrésicos, inmaduros) o sin ovocitos (“en blanco”), por fallo de fecundación (no hay embriones), por fecundación anómala, por embriones parados o no viables, o por riesgo de hiperestimulación ovárica, debiéndose cancelar la transferencia en fresco y criopreservar todos los embriones para un siguiente ciclo.

La estimulación ovárica se realizó con la pauta estandarizada para cada paciente, siendo los medicamentos más utilizados como supresores hipofisarios los siguientes: bajo protocolo largo o corto de análogos de la GnRH o agonistas, el Leuprolide (Procrin[®], Abbott), la Nafarelina (Synarel[®], Schering) y la Triptorelina (Decapeptyl[®], Tecnofarma), y como protocolo multidosis de antagonistas de la GnRH, el cetrorelix (Cetrotide[®], Serono) y el ganirelix (Orgalutran[®], Organon).

Una vez comprobada la desensibilización hipofisaria, se administraron, individualmente, las gonadotropinas en dosis diarias ajustadas en función de la respuesta individual de cada señora, diferenciando entre pacientes normorespondedoras, altas respondedoras y bajas respondedoras y siendo general la pauta de estimulación inducida con una dosis inicial de 100 a 450 UI FSH (Puregon[®], Organon o Gonal[®], Serono) durante 8-12 días (días 2-7 del ciclo) y complementada con 75 UI de LH-RH (Luveris[®], Serono), desde el inicio o a partir de folículos iguales o mayores a 14 mm dependiendo de la pauta de estimulación utilizada.

En las mujeres normorespondedoras, menores de 35 años, con una FSH basal normal y un número de folículos antrales entre 7 y 15, se usa un protocolo largo (pauta larga) de agonistas para la desensibilización hipofisaria, generalmente 0,1 ml de Procrin[®] desde el día 21 del ciclo previo y dosis de 150-225-300 UI/día de FSH (Puregon[®] o Gonal[®]) y LH a partir de folículos de 13-14 mm.

En las altas respondedoras o alta reserva, mujeres con LH/FSH >2, más de 15 folículos antrales en ecografía basal y criterios clínicos de ovario poliquístico, se sigue un protocolo multidosis de antagonistas para la supresión hipofisaria, siendo la dosis

En las bajas respondedoras, pacientes que no responden de forma suficiente a la estimulación hormonal convencional, mayores de 40 años, con una FSH basal mayor a 10 UI y un número de folículos antrales inferior a 5, también se utilizan los antagonistas para la desensibilización hipofisaria y dosis iniciales de 225-300-400 UI de FSH junto con LH (HMG_p altamente purificada, Menopur[®], Ferring).

En el laboratorio de Ginefiv todos los días se hace una relación de las punciones que se van a realizar al día siguiente, copiándose los datos en unas hojas de trabajo (figura 4).

N° CICLO		FECHA:		N° HISTORIA:	
TÉCNICA TRATAMIENTO		TÉCNICA LABORATORIO			
FIV	RECEPTORA OVO	Rancho de IP	SEMEN DONANTE		
ICSI	RECEPTORA (OVO ICSI) / YESA	Rancho de IP	HATCHING		
YESA			CULTIVO LARGO		
MIXTA FIV-ICSI	DONANTE OVOCITOS	Uterus a IP	EPI		
TELEFIV	TEL EPI RECEPTORA	Rancho de IP	PCR HIV		
TELEFIV ICSI / YESA	TELEFIV ICSI / YESA RECEIPT	Rancho de IP	PCR HEP B		
OTRAS:					
MUJER:		EDAD:			
VARON:		SOCIEDAD:			
TELÉFONO:		ENVIADA DÍA:		ESTUFA:	
INDICACION FEMENINA:	INDICACION MARCULINA:	OTRAS (GRIPOPATIA, FRACASO LA, FRACASO FIV):			
RAZA BLA:	ALERGIA:	CONSENTIMIENTO INFORMADO CÍD ADPTO POR... E ADPTO		<input type="checkbox"/> CONCELA EMBRIONES	
RAZA EL:		OVOCITOS A INSEMINAR:		<input type="checkbox"/> ECO ANTES DE TRANSFER	
POLICULO:		FIV ANTERIORES			
		OVOCITOS ATENCION EMBRIONES N° CICLO			
ANESTESIA:					
SEMI PREVO:	SEMEN FRESCO / COND / DON	CALEDA DIA PUNCIÓN	METODO PREPARACION	BIOLOGO	
PUNCIÓN OVOCITO:		ATENCION:		GISE PUNCIÓN:	
OBSERVACIONES:				BIOLOGO PUNCIÓN:	
				HORA PUNCIÓN:	
FIV OVO INSEMINADOS	N° ESP/OVOCITO	OBSERVACIONES:		BIOLOGO:	
ICSI M - R:	M - I	P - I	LIMAZOS:	HORA POSM:	
OVO INYECT.		INV EN + I	...OVO	BIOLOGO:	
OBSERVACIONES PENITON: RUT		...ESP	HORA PELADO:	HORA INYECC:	
TRANSFER		N° EMBRIONES	DIA DE TP:	CALEDA:	GISE TRANSFER:
(Estado: FRESCO)		(/ /)		BIOLOGO TRANSFER:	
OBSERVACIONES:				HORA TRANSFER:	
CONGELADOS		N° EMBRIONES	DIA DE CONG:	CALEDA:	BIOLOGO CONG:
		(/ /)		HORA CONG:	

CONG. SEEDING		PAJUELA (color)	BANCO	CANISTER	VISOTUBO	DESCONGELACION / TRANSFERENCIA: <small>Paleta Inseminación — Clonificación — Frasco Transfer Marfajá embrión — (Pratista) — Marfajá embrión y Calidad TP Biológico Inseminación — (Clonificación) — (Pratista) y Clase transfer</small>

40

La punción folicular, guiada con ultrasonografía transvaginal (ecógrafo modelo Aloka SSD-1700, bomba de vacío modelo Labotect, Aspirator 4014 y aguja de punción 17 G), se llevó a cabo a las 36 horas, aproximadamente, de la toma de la hCG, estando la paciente con anestesia local o total (siendo el porcentaje de éstas últimas mucho menor). En una cabina de flujo laminar, con superficie calefactada y sistema de CO₂ acoplado (modelo K-system, IVF Workstation), los ovocitos fueron aspirados del líquido folicular, lavados en sus placas correspondientes de lavado, y colocados en sus respectivas placas de medio de cultivo en el interior de una estufa, o incubador (modelo C200, Labotect), a 37°C y 6 % de CO₂, perfectamente identificados. Los medios utilizados para gametos y embriones son los de la serie G III, de Vitrolife, que se caracterizan por estar suplementados, la mayoría de ellos, con Albúmina Sérica Humana (HSA-Solution™, Human Serum Albumin): G-Fert™, G1™ y G2™. Las placas están cubiertas por aceite mineral embriotestado (Ovoil™).

Las biopsias testiculares se realizaron con anestesia local un tiempo antes del día de la punción folicular, siendo las muestras criopreservadas, tras ser valoradas como válidas, tanto en fresco como después de ser descongeladas. Para la valoración se usó Pentoxifilina (PTX, Sigma Aldrich). La muestra de semen de la FIV convencional o de la microinyección era obtenida el mismo día de la punción, con una serie de requisitos, o bien días, meses o años antes y criopreservada por varios motivos: radioterapia o quimioterapia, vasectomía, eyaculación retrógrada, viajes continuos por motivos de trabajo, nervios y posible bloqueo en la obtención de la muestra el día de la punción, baja calidad seminal, lavado previo por PCR para HIV, HCV ó HBV, etc.

Las muestras de tejido testicular fueron descongeladas tras la obtención de ovocitos en la punción folicular, y capacitadas mediante concentración, lavado y posterior adicción de Pentoxifilina (para mejorar la motilidad espermática) en proporción 1:1 a las gotas de medio con espermatozoides procedentes de dicho tejido, si se trataba de un ciclo de TESE+ICSI. Las muestras de ICSI y FIV convencional, tanto las “frescas” como las criopreservadas, se capacitaron mediante gradiente de densidad o mediante “gotitas” si se trataba de un factor masculino severo.

El semen, una vez capacitado (mejorado), se dejó incubando en la estufa, a 37°C y 6% de CO₂, formando gotitas en una placa, cubiertas con aceite mineral (TESE+ICSI

y factor masculino severo) o en tubo de fondo cónico, formando un ángulo de 45° para facilitar el “swim-up” de los espermatozoides (FIV convencional e ICSI sin factor masculino severo), todas identificadas con el nombre de la pareja y el número de Historia clínica.

Todos los ovocitos de la FIV convencional fueron inseminados transcurridas unas horas desde la punción folicular. Sólo los ovocitos en metafase II (M-II, maduros), previamente decumulados, mediante acción química (enzima hialuronidasa, Hyase™ - 10x, Vitrolife, diluida en una relación 1:9 con el medio Gamete™, Vitrolife) y mecánica (Stripper®), fueron inyectados en microscopio invertido (con óptica Hoffman, Nikon Diaphot 200 y Nikon Eclipse TE-2000-S) y pletina calefactada (Termo Plate®, Tokai Hit, LTD). Una vez fecundados, los ovocitos estuvieron en la estufa hasta el día siguiente, en donde se confirmó la fecundación al cabo de 16-20 horas, en un microscopio invertido (de óptica Hoffman, Nikon), a 40x.

Se consideró como embrión bien fecundado aquél que contenía 2 pronúcleos (PN) y 2 corpúsculos polares (CP), siendo el resto mal fecundados (3 PN, 4 PN), no fecundados (1 CP) o “dudosos” (2CP, 1PN y 2 CP). Los ovocitos fecundados se siguieron manteniendo en cultivo en las mismas condiciones durante 24 ó 48 horas, siendo cambiados de placa a un medio nuevo todos los días.

La calidad embrionaria se valoró previamente a la transferencia, utilizando los criterios de ASEBIR (50) y en base al estudio en D+1 o en estadio de pronúcleos (51), a la valoración a las 27 horas (52, 53), en determinados casos y a los criterios morfológicos: número de células y grado de fragmentación (54), en D+2 y D+3, estableciéndose 4 categorías o calidades, relacionadas con el pronóstico de embarazo: Muy buena (1,0,0,0), Buena (0,1,0,0), Regular (0,0,1,0) y Mala (0,0,0,1). Se hizo especial hincapié en los embriones dados como “dudosos” en día +1, y que, en su mayoría, fueron considerados como embriones viables (si el desarrollo embrionario fue correcto), pero no transferibles en fresco, siendo criopreservados en la mayor parte de los casos. También se valoraron los embriones bloqueados o parados, así como los que presentaban un alto grado de fragmentación, blastómeras multinucleadas o un ritmo de división inadecuado, considerados todos ellos como no viables.

En los ciclos programados para ello se realizó la técnica del hatching asistido, de tipo químico, con ácido Tyrode o Tyrodes (Acidief Tyrodes Solution, pH 2,3-2,4, Medi Cult), con o sin aspiración de fragmentos.

La transferencia uterina de los embriones se realizó bajo control ecográfico y sondas de tipo rígido (Gynetics, Emtrac Set, Gynetics Medical Products) o más flexibles (Labotect, Embryo Transfer Catheter Set, Labotect). Los embriones no transferidos se criopreservaron para poder ser transferidos en ciclos posteriores (no estudiados). Se realizó soporte de fase lútea con progesterona natural micronizada (Progeffik[®], Effik), administrada oral o vaginalmente en dosis de 600 mg/día (en tres dosis de 200 mg), desde el día de la punción. El embarazo se determinó mediante una primera medida de hormona β -hCG en sangre a los 13-15 días post-transferencia, o por un Predictor, prueba en orina, a los 16-18 días post-transfer. La gestación se confirmó con una ecografía a los 21 días post-transferencia. En el estudio se tuvieron en cuenta sólo los embarazos en donde se confirmó la presencia de latido cardíaco fetal (LCF) con una ecografía en la sexta semana de gestación.

III.4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se utilizó el programa informático SPSS versión 12.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). En el caso de las variables cualitativas, el análisis descriptivo de datos se realizó mediante tablas de distribución de frecuencias absolutas y porcentajes. Las variables cuantitativas se expresaron mediante media y desviación estándar. Para comprobar la normalidad de las distribuciones de las variables se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

Los factores que se compararon entre el grupo con fallo de fecundación y el grupo de embarazadas fueron los siguientes: edad, FSH, calidad seminal, indicaciones femeninas, tipo de T.R.A., número de folículos puncionables, ovocitos obtenidos, atrésicos, inmaduros, madurados, maduros, calidad y total de ovocitos inseminados o inyectados.

Para el análisis de variables cuantitativas con variables cualitativas dicotómicas, se utilizó el test “t” de Student y la prueba de Levene para la igualdad de varianzas. Cuando las variables fueron cualitativas, se utilizó el test de “Chi” Cuadrado. Se estableció un error $\alpha=5\%$ y una potencia del 80%.

Se fabricó un modelo de regresión logística para el cálculo de la estimación de la probabilidad de embarazo a partir de una serie de las variables estudiadas.

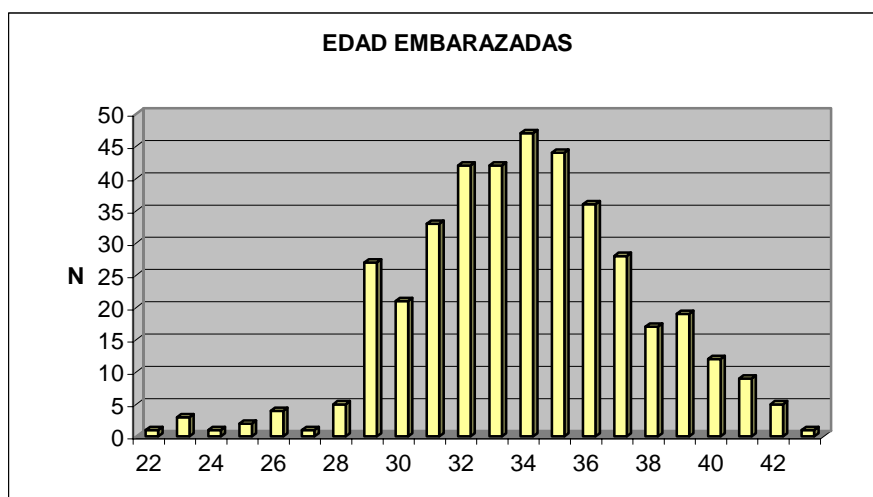
IV.- RESULTADOS

IV.1.- ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

IV.1.A.- GRUPO DE EMBARAZADAS

IV.1.A.1.- Edad

La edad media del grupo de embarazadas es de $33,9 \pm 3,62$ (media \pm desviación típica o estándar) años y el rango varía entre los 22 y los 43 años. La moda o valor que más se repite es el de 34 años de edad (47 veces, un 11,75% de los casos). Se considera como factor etario a las mujeres con edades iguales o superiores a los 37 años. En el grupo de las embarazadas hay 91 pacientes añosas, lo que supone un 22,75% (91/4) del total. La gráfica de frecuencias de la edad es la siguiente (gráfica 1):



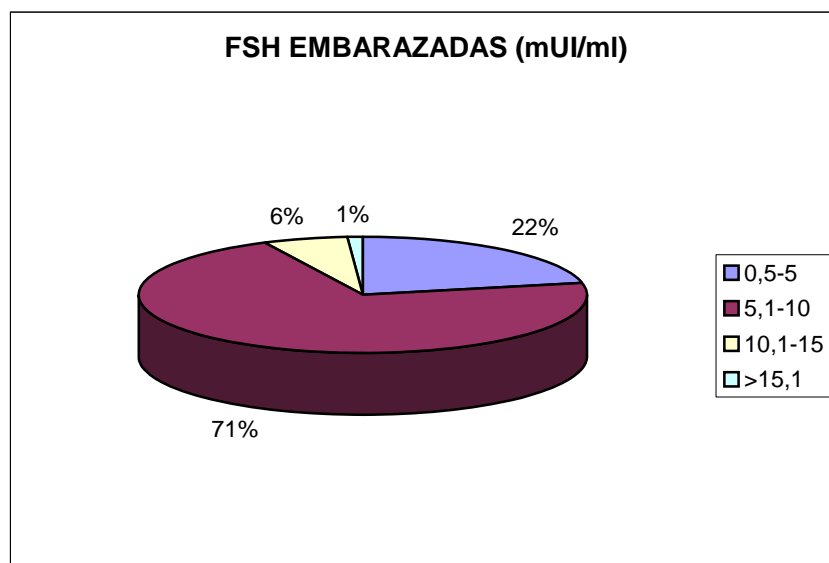
Gráfica 1: Frecuencia de edades del grupo de embarazadas

IV.1.A.2.- FSH

La medición media de la FSH en el tercer día del ciclo en el grupo de embarazadas dio como resultado: $6,98 \pm 2,93$ mUI/ml. Se podría considerar una FSH alta a partir de 10 mUI/ml. En este grupo el número de mujeres con FSH alta es de 29, es decir, el 7,25% (29/4) del total. La tabla de frecuencias (tabla 1 y gráfica 2), distribuida por rangos, en este caso cuartiles, es la siguiente:

FSH (mUI/ml)	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
0,5-5	87	21,75
5,1-10	284	71
10,1-15	24	6
>15,1	5	1,25
TOTAL	400	100

Tabla 1: Frecuencia de la FSH por rangos



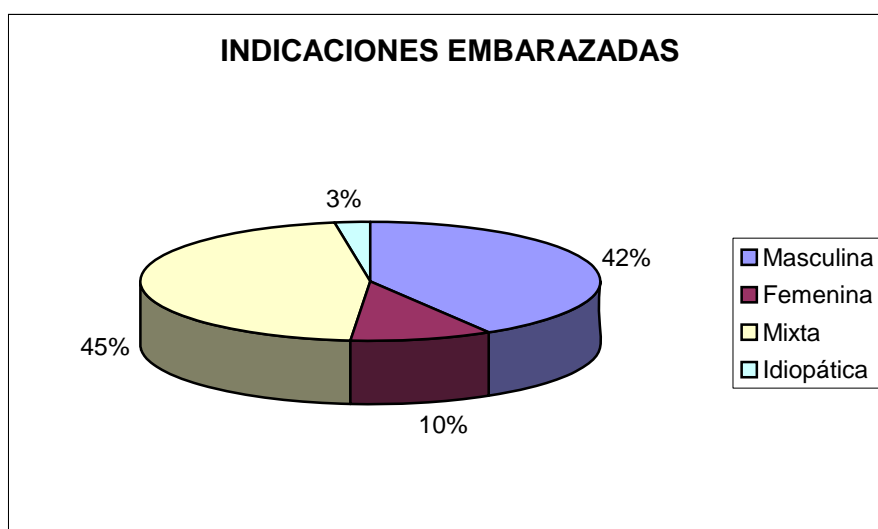
Gráfica 2: Porcentajes de la FSH por rangos (cuartiles)

IV.1.A.3.- Indicación

Las distintas indicaciones quedan recogidas en la tabla 2 y gráfica 3:

Indicación	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Masculina	166	41,5
Femenina	40	10
Mixta	184	46
Idiopática	10	2,5
TOTAL	400	100

Tabla 2: Indicaciones del grupo de embarazadas



Gráfica 3: Porcentaje de las indicaciones en el grupo de embarazadas

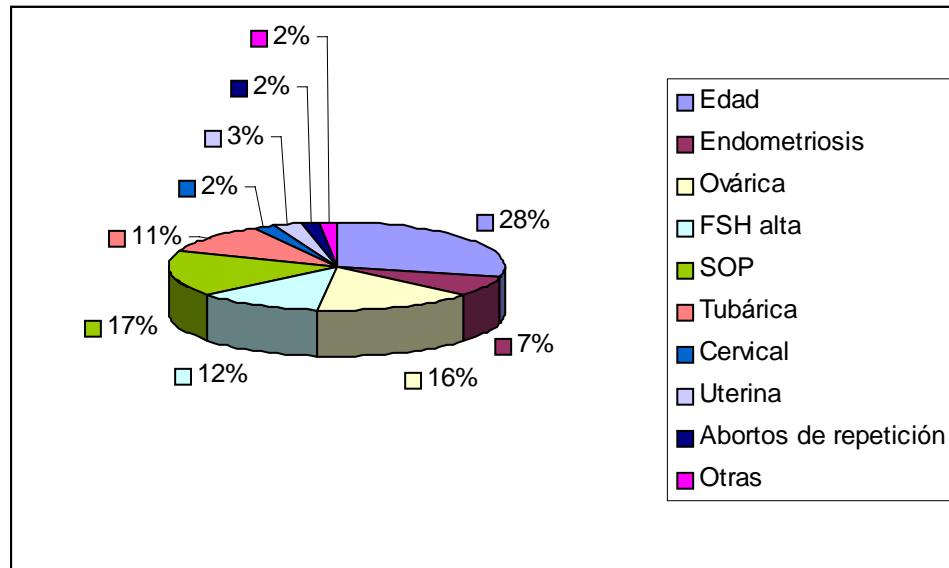
IV.1.A.4.- Indicaciones Femeninas

Se encuentran en 224 pacientes, entre indicaciones femeninas y mixtas, lo que representa un 56% con respecto al resto de factores (masculino, idiopático). En varias pacientes (un total de 69, un 30,80%) hay más de una indicación, lo que hace un total de 313 antecedentes femeninos diferentes. Existen 53 mujeres (23,66%) con 2; 13 (5,8%) con 3; 2 pacientes (0,89%) con 4 y 1 señora (0,45%) hasta con 5 indicaciones distintas. La FSH se considera alta a partir de un valor de 10 mUI/ml y el SOP es el Síndrome de Ovario Poliquístico. La tabla 3 resume las principales indicaciones femeninas en el grupo de las gestantes.

Indicación Femenina	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Edad	91	29,07
Endometriosis	23	7,35
Ovática	49	15,65
FSH alta	37	11,82
SOP	53	16,93
Tubática	35	11,18
Cervical	6	1,92
Uterina	9	2,85
Abortos de repetición	5	1,6
Resto	5	1,6
TOTAL	313	99,97

Tabla 3: Principales indicaciones femeninas del grupo de embarazadas

La gráfica 4 representa los porcentajes de las principales indicaciones femeninas. Por ejemplo, la endometriosis afecta a 23 pacientes, lo que supone un 7,35% del total de dicho grupo.



Gráfica 4: Porcentajes de las principales indicaciones femeninas en el grupo de embarazadas

IV.1.A.5.- Indicaciones Masculinas

1.- Calidad seminal:

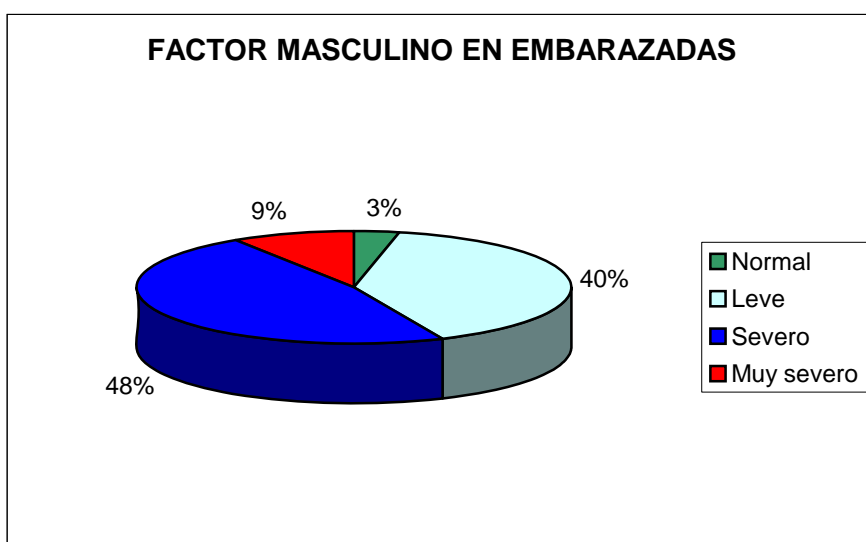
El factor masculino afecta a 350 parejas del grupo gestante, es decir, el 87,5% del total, entre indicaciones masculinas y mixtas. En algunas ocasiones la calidad seminal el día de la punción no coincide con la prueba inicial de semen realizada al varón, y que si por ejemplo era normal, no contabilizaba como factor masculino o mixto; por ello el número de alteraciones seminales varía con respecto a los casos de factor o indicación masculina detectados en una primera consulta.

A veces la morfología se encuentra en los valores límite de 30% (normales) y 70% (anómalas), por lo que se considera muestras con mala morfología, sin llegar al diagnóstico de teratozoospermia.

Dado el gran número de indicaciones masculinas diferentes que existen, con intención práctica se pueden agrupar en base a su grado de severidad en cuatro grados como se muestra en la tabla 4 y gráfica 5 para nuestra muestra.

Semen	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Normal	13	3,25
Leve	160	40
Severo	190	47,5
Muy severo	37	9,25
TOTAL	400	100

Tabla 4: Calidad seminal en base al grado de severidad



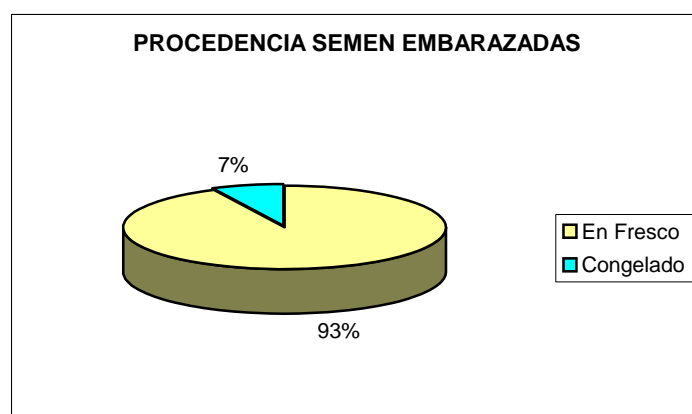
Gráfica 5: Calidad seminal del grupo de embarazadas según el grado de severidad

2.- Procedencia de la muestra:

La muestra seminal puede ser en fresco, cuando se obtiene el mismo día de la punción y como máximo una hora antes de comenzar la capacitación, o congelada, cuando el paciente ha criopreservado la muestra un tiempo antes de comenzar el ciclo y se ha mantenido en bancos llenos de nitrógeno líquido, a una temperatura aproximada de -196°C . En el grupo gestante la procedencia de la muestra se divide según la tabla 5 y gráfica 6:

Procedencia	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
En Fresco	371	92,75
Congelado	29	7,25
TOTAL	400	100

Tabla 5: Procedencia del semen del grupo de embarazadas



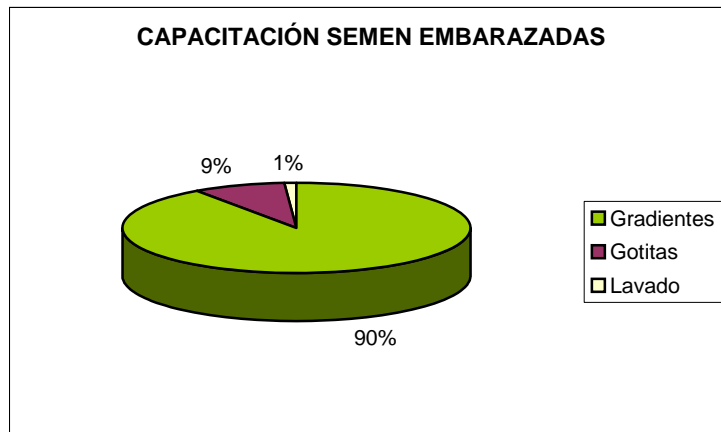
Gráfica 6: Procedencia del semen del grupo de embarazadas

3.- Capacitación de la muestra:

Cuando la muestra se capacita de forma normal mediante gradientes de densidad, se denomina “gradientes”; cuando se requiere de una capacitación especial, se denomina “de gotitas”, para muestras muy severas o TESE, y cuando la muestra se ha analizado mediante PCR y criopreservado en los casos de HBV, HCV y HIV, se denomina: “lavado”. Su distribución queda establecida según la siguiente tabla 6 y gráfica 7:

Capacitación	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Gradientes	361	90,25
Gotitas	34	8,5
Lavado	5	1,25
TOTAL	400	100

Tabla 6: Capacitación de las muestras del grupo de embarazadas



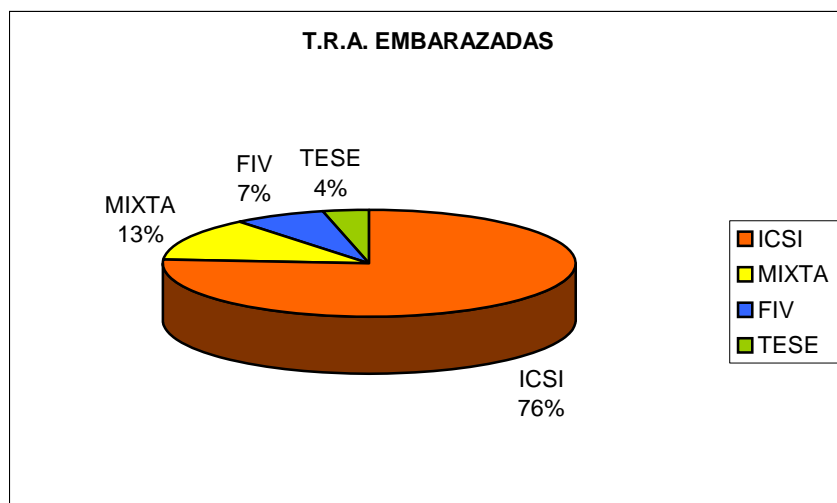
Gráfica 7: Capacitación del semen del grupo de embarazadas

IV.1.A.6.- Técnicas de Reproducción Asistida

En el grupo de las embarazadas quedan establecidas según la tabla 7 y gráfica 8, en donde la técnica “TESE” es en realidad biopsia testicular más microinyección espermática y la técnica “FIV” es Fecundación “In Vitro” convencional. La técnica de la ICSI, ya sea pura o mixta se produce en un total de 372 ciclos de los 400, lo que supone un 93% de los casos. Sin embargo, a la hora de interpretar datos de madurez y calidad ovocitaria sólo se tienen en cuenta los ciclos de ICSI y TESE (79,75%), pues los de técnica mixta se estudian junto a los de FIV convencional.

T.R.A.	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
ICSI	304	76
MIXTA	53	13,25
FIV	28	7
TESE	15	3,75
TOTAL	400	100

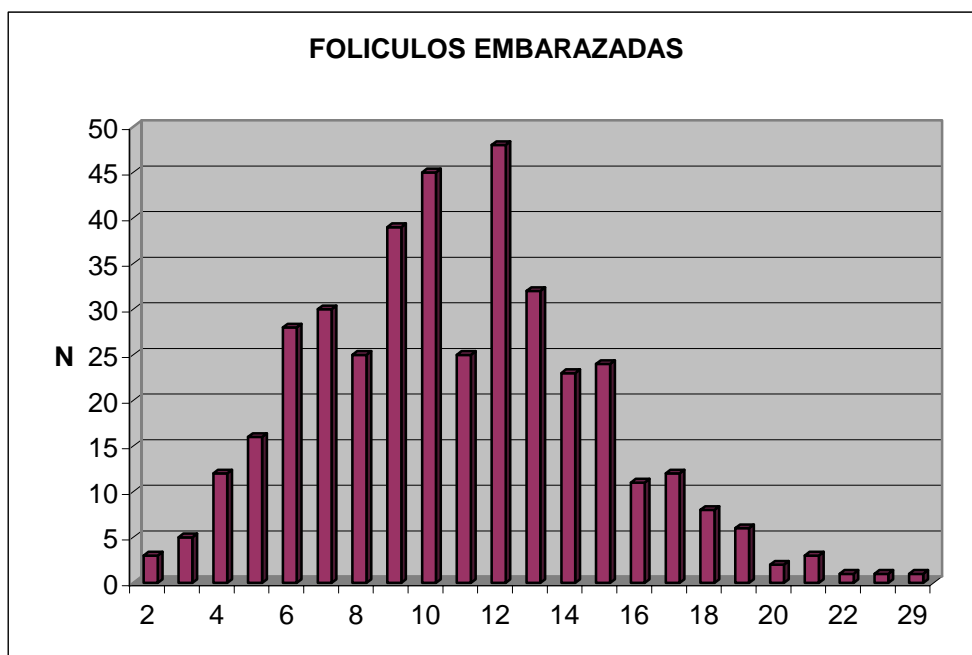
Tabla 7: Distribución de las T.R.A. en el grupo de embarazadas



Gráfica 8: Distribución de las T.R.A. en el grupo de embarazadas

IV.1.A.7.- Folículos

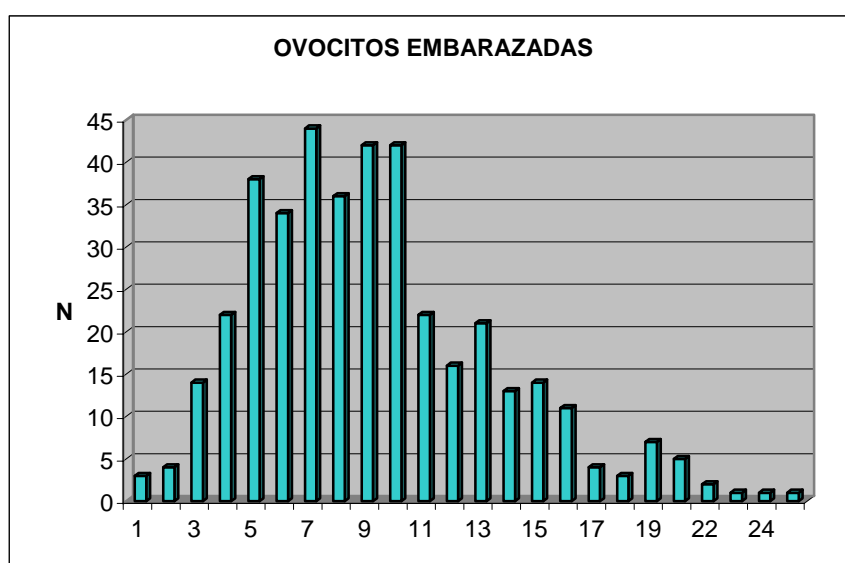
El número total de folículos puncionables mayores de 1,3 cm en el grupo gestante es de 4.292, siendo la media de $10,73 \pm 4,07$ folículos/ciclo y el rango varía entre 2 y 29 folículos. La moda es de 12 (48 veces, un 12% del total). La gráfica 9 muestra su distribución:



Gráfica 9: Frecuencia del número de folículos del grupo de embarazadas

IV.1.A.8.- Ovocitos

El número total de ovocitos obtenidos después de la punción transvaginal ecoguiada en el grupo de embarazadas es de 3.675, y la media de $9,19 \pm 4,29$ ovocitos/ciclo, siendo el rango entre 1 y 25 ovocitos y la moda de 7 (44 veces, un 11%). El porcentaje de ovocitos obtenidos con respecto a los folículos medidos es del 85,62%. Su correspondiente gráfica, la número 10, de frecuencias lo muestra claramente:



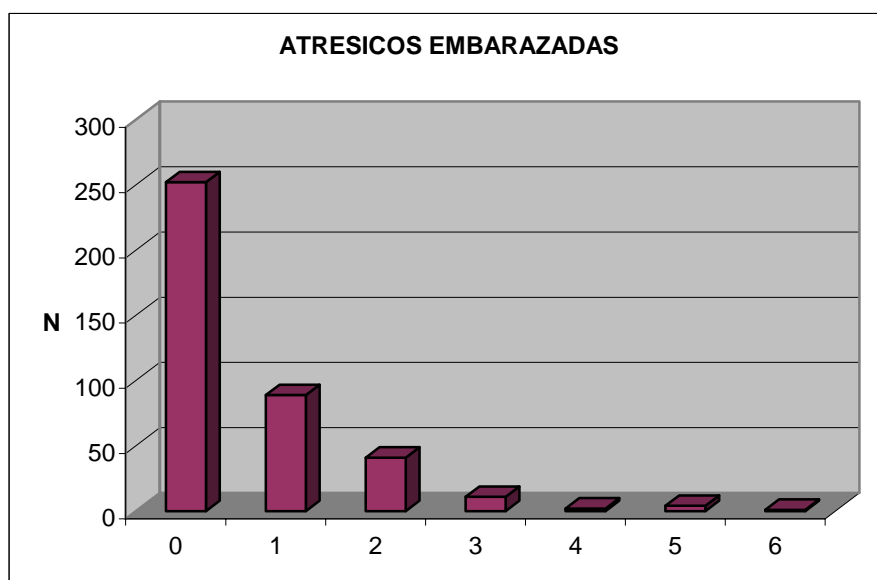
Gráfica 10: Frecuencia del número de ovocitos del grupo de embarazadas

IV.1.A.9.- Ovocitos Atrésicos

El número total de ovocitos atrésicos del grupo gestante es de 238, siendo la media de $0,6 \pm 0,97$, con un rango entre 0 y 6; la moda es 0 (252 veces, un 63%). El porcentaje de ovocitos atrésicos con respecto al total de ovocitos obtenidos en dicho grupo es del 6,48%. A continuación se detallan la tabla de frecuencias (tabla 8) y su figura correspondiente (gráfica 11).

Atrésicos	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
0	252	63
1	89	22,3
2	41	10,3
3	11	2,8
4	2	0,5
5	4	1
6	1	0,3
TOTAL	400	100,2

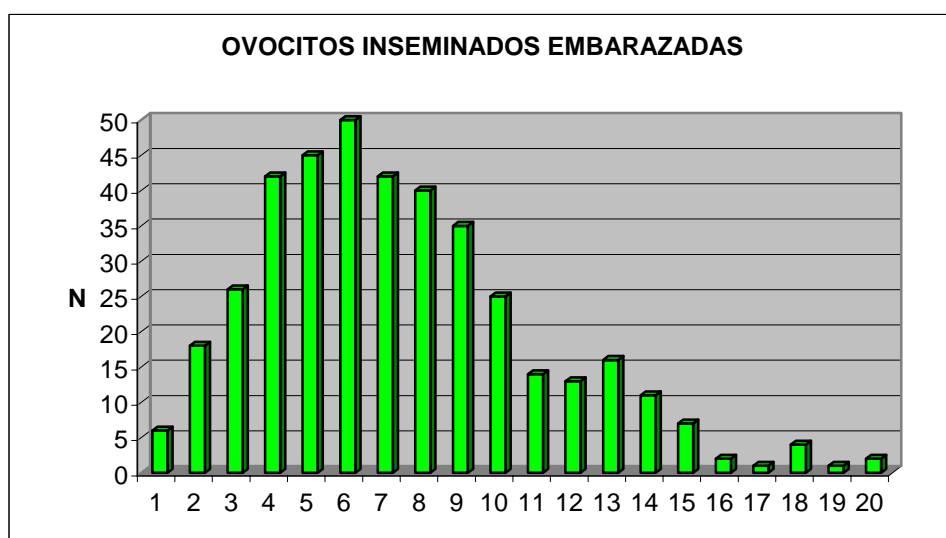
Tabla 8: Frecuencia de los ovocitos atrésicos



Gráfica 11: Diagrama de los ovocitos atrésicos

IV.1.A.10.- Ovocitos Inseminados

Los ovocitos inseminados o fecundados totales representan un 80,24% del total de ovocitos del grupo de las embarazadas, es decir, 2.949, con una media de $7,37 \pm 3,67$ ovocitos inseminados/ciclo. El rango se sitúa entre 1 y 20 y la moda es 6 (50 veces, un 12,5%). La gráfica de frecuencias es la siguiente (gráfica 12):



Gráfica 12: Ovocitos inseminados en el grupo de embarazadas

IV.1.A.11.- Datos grupo embarazo por T.R.A.

Los datos analizados hasta el momento (tabla 9) son el total de folículos, ovocitos, ovocitos atrésicos y ovocitos inseminados en todos los ciclos del grupo gestante. A partir de ahora se tendrá en cuenta la técnica utilizada, dividiendo los cuatro grupos anteriores (ICSI, TESE, FIV y Mixta) en dos. Por un lado todos los ciclos con ICSI pura y TESE (319 ciclos, el 79,75%) y por el otro la FIV y la mixta (81 ciclos, el 20,25%), de tal manera que en el primer grupo se podrán estudiar también los ovocitos una vez decumulados y dividirlos en inmaduros (Metafase I y Profase I), madurados (de M-I a M-II) y maduros (Metafase II); y en buenos, regulares o malos según la calidad ovocitaria en el momento de la microinyección. Los ovocitos inyectados de los ciclos con técnica mixta no se tuvieron en cuenta para este estudio.

	CICLOS	MEDIA ± DT	MODA	SUMA	%	MINIMO	MAXIMO	RANGO
EDAD	400	33,9 ± 3,62	34	-	-	22	43	21
FSH (mUI/ml)	400	6,98 ± 2,93	6	-	-	1	36,8	35,8
FOLICULOS	400	10,73 ± 4,07	12	4.292	-	2	29	27
OVOCITOS	400	9,19 ± 4,29	7	3.675	85,62	1	25	24
ATRESICOS	400	0,6 ± 0,97	0	238	6,48	0	6	6
INSEM	400	7,37 ± 3,67	6	2.949	80,24	1	20	19

Tabla 9: Resumen de datos del grupo de embarazadas

Los datos referentes a folículos, ovocitos, atrésicos e inseminados divididos por las técnicas se pueden resumir en la siguiente tabla (tabla 10):

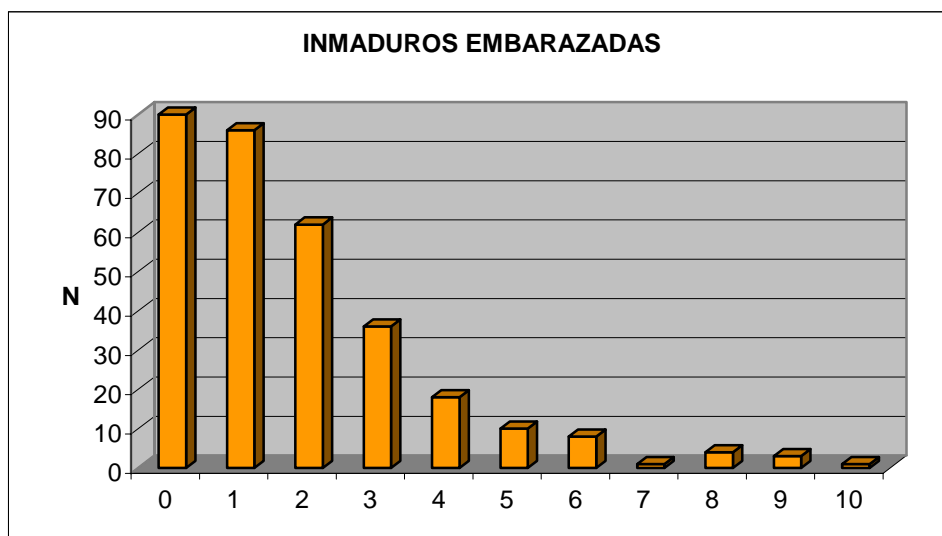
	CICLOS	MEDIA \pm DT	%
FOLIC ICSI	319	10,82 \pm 4,17	80,43
OVOC ICSI	319	9,11 \pm 4,35	79,1
ATR ICSI	319	0,53 \pm 0,91	5,81
INYECT ICSI	319	7,05 \pm 3,64	77,4
FOLIC FIV	81	10,37 \pm 3,65	19,57
OVOC FIV	81	9,48 \pm 4,05	20,9
ATR FIV	81	0,85 \pm 1,17	8,98
INSEM FIV	81	8,63 \pm 3,55	91,02

Tabla 10: Resumen de datos del grupo de embarazadas por T.R.A.

a.- Datos grupo FIV: Los comentados en la tabla 10.

b.- Datos grupo ICSI

1.- Ovocitos Inmaduros: El total de ovocitos inmaduros es de 564, lo que supone un 19,4% del total de ovocitos de ICSI y una media de $1,77 \pm 1,89$ ovocitos inmaduros/ciclo. El rango varía entre 0 y 10 y la moda es 0, que se repite 90 veces, un 28,2%. La gráfica de frecuencias (gráfica 13) viene a continuación:

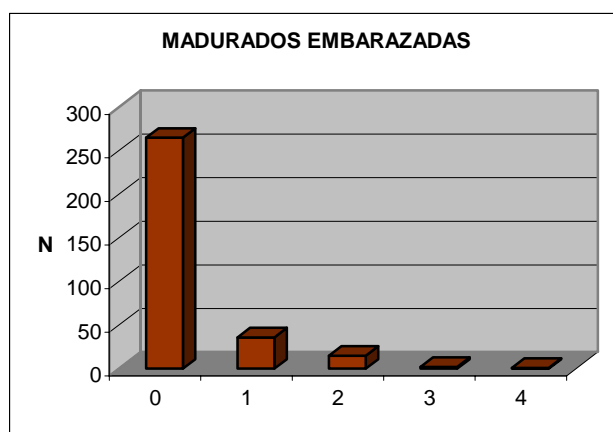


Gráfica 13: Ovocitos inmaduros del grupo ICSI-embarazadas

2.- Ovocitos Madurados: Los ovocitos madurados en principio se encontraban en el estadio de Metafase-I y han expulsado el corpúsculo polar (CP) estando en incubación. Es lo que se denomina “maduración in vitro”. Son un total de 76 ovocitos, con una media de $0,24 \pm 0,59$, lo que supone un 13,48% del total de ovocitos que en principio estaban inmaduros. De nuevo la moda es 0 (265 veces, un 83,1%) y el rango se sitúa entre 0 y 4. Su tabla (tabla 11) y gráfica (gráfica 14) de frecuencias son estas:

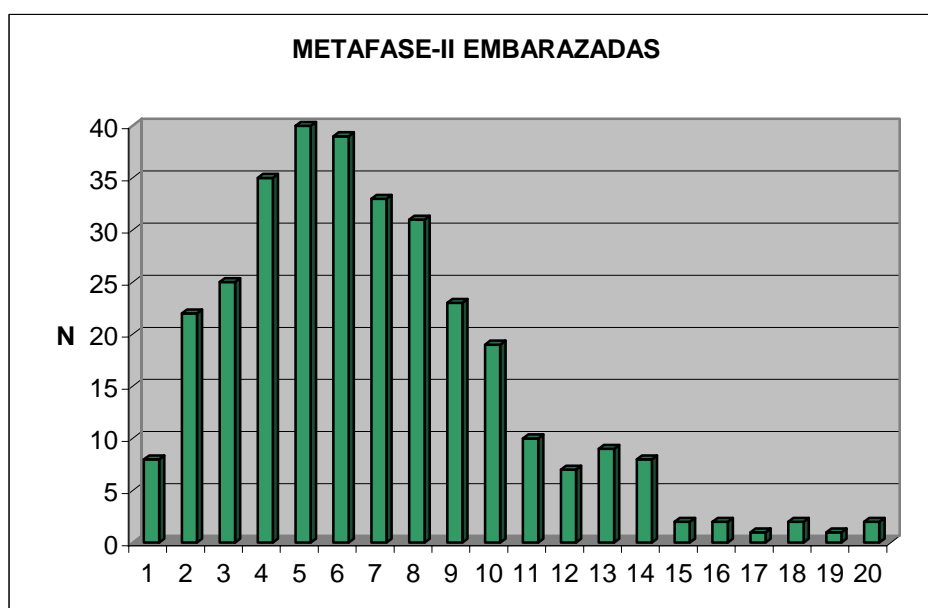
Madurados	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
0	265	83,1
1	36	11,3
2	15	4,7
3	2	0,6
4	1	0,3
TOTAL	319	100

Tabla 11: Ovocitos madurados del grupo ICSI-embarazadas



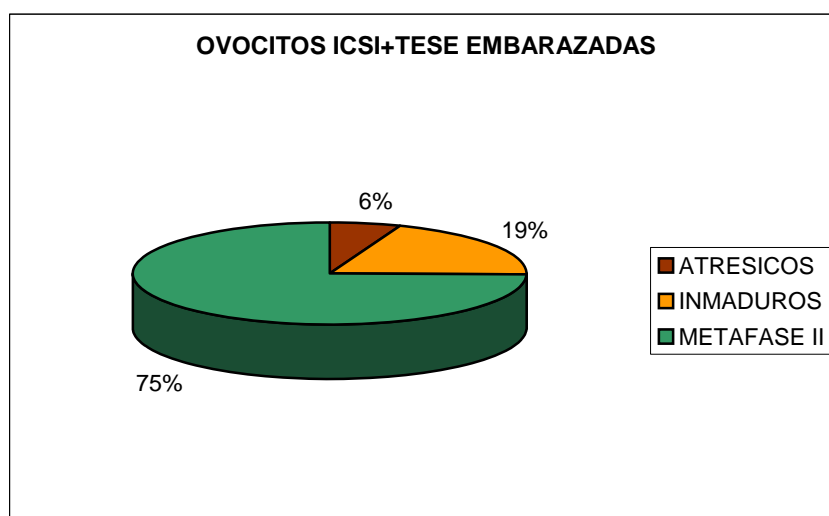
Gráfica 14: Ovocitos madurados del grupo ICSI-embarazadas

3.- Ovocitos Maduros o Metafase-II: Son los ovocitos aptos para la microinyección. Se contabilizan como maduros sólo los que tienen expulsado el CP tras ser decumulados. Suponen un total de 2.174 ovocitos (el 74,78% del total de ovocitos de ICSI), con una media de $6,82 \pm 3,63$ ovocitos maduros/ciclo y un rango entre 1 y 20. La moda es 5 (40 veces se repite, un 12,5%). Su gráfica de frecuencias es (gráfica 15):



Gráfica 15: Ovocitos maduros o Metafase-II del grupo de embarazadas

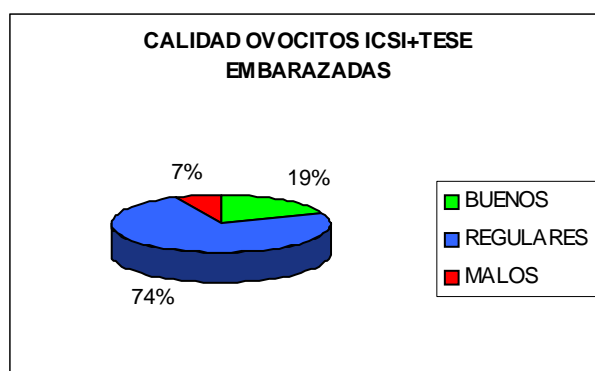
Si hiciéramos una gráfica dividiendo el total de ovocitos de la ICSI en tres grandes grupos: metafase-II, inmaduros y atrésicos, el resultado sería el siguiente (gráfica 16):



Gráfica 16: Clasificación de Ovocitos de la ICSI en el grupo de las embarazadas

4.- Calidad Ovocitaria: Los ovocitos inyectados se pueden clasificar en base a sus dismorfismos ovocitarios y cómo han respondido a la técnica de la microinyección en tres clases: buenos, regulares y malos. La mayoría de los ovocitos tienen alguna característica en su morfología, ya sea a nivel del citoplasma (inclusiones, vacuolas), del CP (grande, pequeño, fragmentado), de la zona pelúcida (tabicada, estrecha, densa, elongada) o del espacio perivitelino (ocupado por “detritus”, elongado), etc, por lo que

se clasifican como “regulares” (74,62%), siendo en verdad como la media. Sólo los ovocitos que responden muy bien a la técnica, formando el típico “cono de microinyección”, y sin ningún dismorfismo, son considerados como “buenos” o perfectos (18,58%). Los de mala calidad tienen más de un dismorfismo y no forman el “cono” característico (6,8%). La gráfica de los ovocitos según su calidad sería esta (gráfica 17):



Gráfica 17: Clasificación de los ovocitos de la ICSI según su calidad.

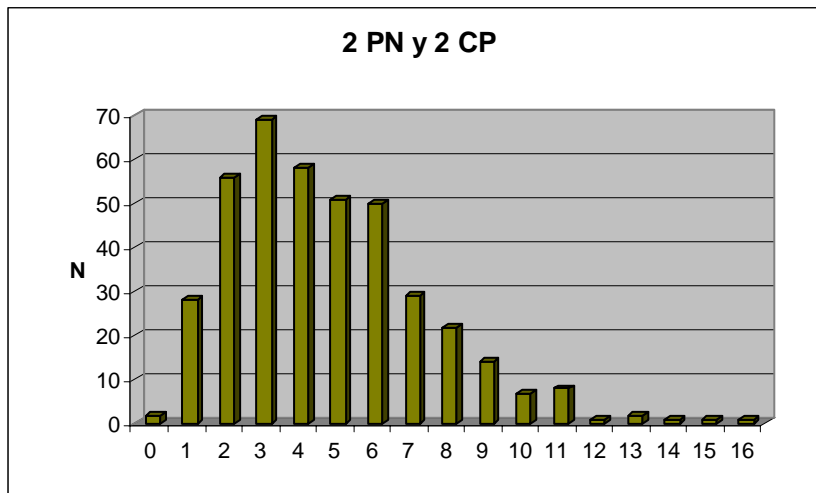
Los datos de los ovocitos buenos, regulares y malos se describen en la tabla 12.

	CICLOS	MEDIA \pm DT	MODA	SUMA	%	MINIMO	MAXIMO	RANGO
BUENOS	319	1,31 \pm 2	0	418	18,58	0	11	11
REGULARES	319	5,26 \pm 3,57	5	1.679	74,62	0	20	20
MALOS	319	0,48 \pm 1,61	0	153	6,8	0	13	13

Tabla 12: Datos de los ovocitos de ICSI según calidad en las embarazadas

IV.1.A.12.- Embriones en D+1: 2 PN y 2 CP

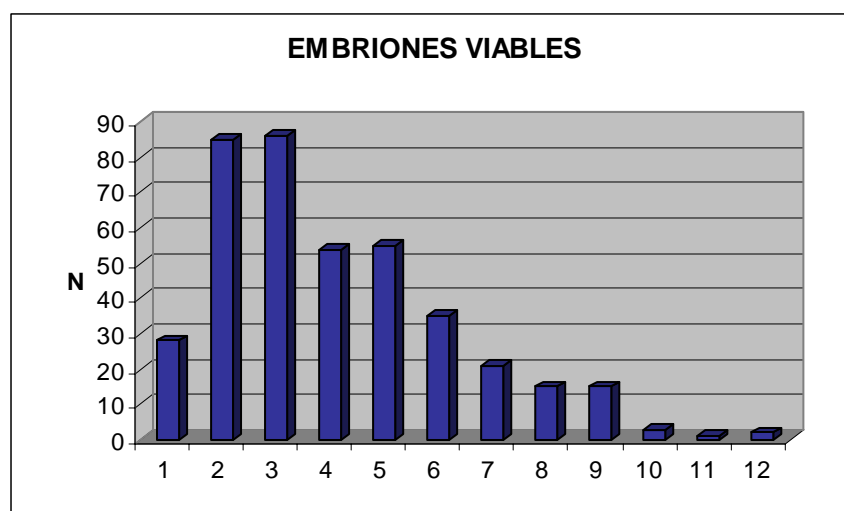
Se considera embrión bien fecundado en D+1, preembrión, cigoto o pre-cigoto a todo aquel en donde se observan claramente 2 pronúcleos (PN) y 2 corpúsculos polares (CP). El porcentaje de fecundación viable se calcularía dividiendo el número de embriones viables en D+1 entre el de ovocitos inseminados y multiplicando por 100 ($63,75\% = 1.880/2.949 \times 100$), no teniendo en cuenta los embriones no viables (3 PN) o todos los considerados como “dudosos” (2 CP, 1 PN), que si siguen una evolución correcta en D+2 pasarían a ser también contados como viables (por eso también hay datos en donde se cuenta 0 en 2 PN y 2 CP). La gráfica 18 muestra los embriones en D+1:



Gráfica 18: Embriones en D+1 del grupo de embarazadas, en 2 PN y 2 CP

IV.1.A.13.- Embriones en D+2 ó D+3

Se consideran embriones viables, ya sea en D+2 ó en D+3 a todos aquellos que cumplen una serie de requisitos en cuanto a número de células, tamaño y simetría de las mismas, ritmo de división, grado de fragmentación, estructura del citoplasma y de la zona pelúcida, división correcta a las 27 horas, no multinucleación y el resto de parámetros estudiados acorde con las características descritas por ASEBIR (Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción). Del total de embriones bien fecundados en D+1 y embriones “dudosos” se llega al 86,38% que representan viabilidad en el día de la transferencia, ya sea por “parada embrionaria”, al no seguir evolucionando de forma correcta, o porque se han tornado “no viables”, sobre todo por alto grado de fragmentación o por multinucleación en D+2. Los casos con un número de embriones viables entre 2 y 3 se sitúan en el 43% aproximadamente. Su gráfica de frecuencias es la que sigue (gráfica 19):

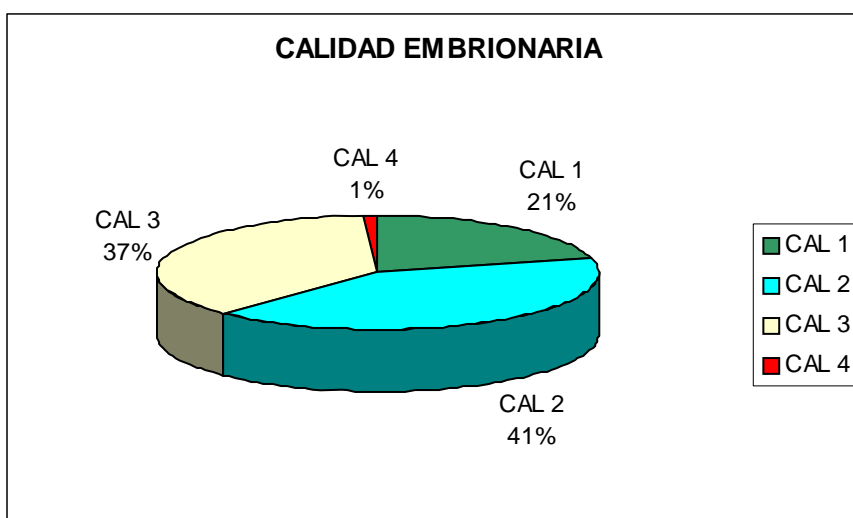


Gráfica 19: Embriones viables en D+2 y D+3 del grupo de las embarazadas

a.- Calidad Embrionaria

Los embriones viables en D+2 ó D+3 se clasifican en base a todos los parámetros anteriores según el mejor o peor pronóstico de embarazo: a mejor calidad más posibilidades de implantación y, por tanto, de embarazo. La clasificación de los embriones es la utilizada por el grupo ASEBIR, considerando al embrión como un “todo”, desde el D+1 hasta el día de la transferencia.

Los embriones se clasifican en: muy buenos o de calidad 1, buenos o de calidad 2, regulares, medianos o de calidad 3 y malos o de calidad 4. Hay que tener en cuenta que últimamente este tipo de embriones son mínimos dado que debido a sus características, y si hay más embriones, se dejarían evolucionar 24 horas más, y si es así se criopreservarían; en caso contrario se desechan. En la mayoría de los ciclos se contabilizan los embriones de la 4ª categoría al no haber ninguno más. La gráfica 20 refleja el porcentaje según la calidad embrionaria:

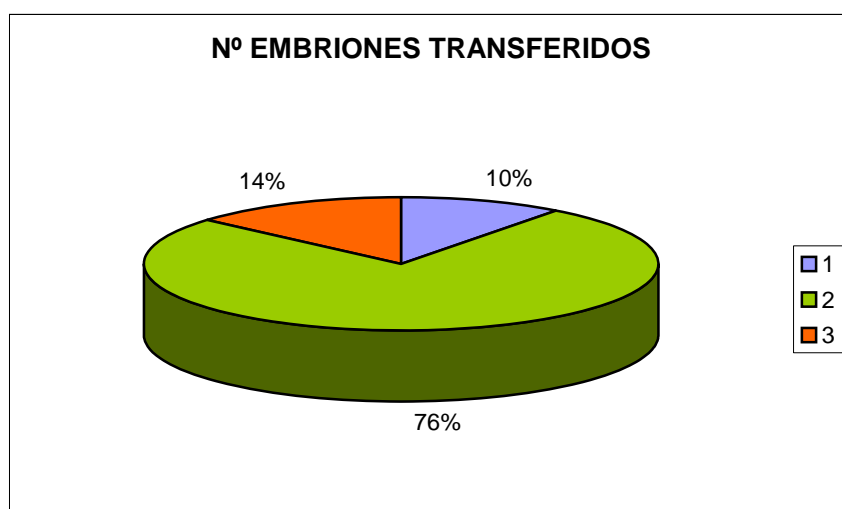


Gráfica 20: Calidad embrionaria en D+2 y D+3

b.- Embriones Transferidos

El número de embriones transferidos varía de 1 a 3. Lo normal es hacer la transferencia de 2 embriones (en 305 ciclos, un 76,25% del total así ocurre). La transferencia selectiva de un único embrión de momento no es posible en nuestro centro y sólo sería aplicable en mujeres jóvenes con varios embriones de buena calidad y primer ciclo. La mayoría de las transferencias de un único embrión (41 ciclos, 10,25%) son debidas a que no había más embriones para transferir (lo que ocurre en 28 de los 41 ciclos: 68,29%).

El número máximo de embriones a transferir establecido por la ley es de 3 y en nuestro centro sólo se aplica en casos concretos: mujeres con una cierta edad (mayores de 35 años) y nunca en los dos primeros ciclos, pacientes con más de dos ciclos sin embarazo, o en ciclos con embriones de calidad regular, lo que ocurre en 54 ciclos (13,5%). Los embriones no transferidos se han de criopreservar, lo que se produce en 257 ciclos, el 67,25% del total de ciclos del grupo gestante. La gráfica 21 muestra los distintos porcentajes del número de embriones transferidos por ciclo:



Gráfica 21: Número de embriones transferidos por ciclo

La tabla 13 resume las variables estudiadas sólo en el grupo de las embarazadas:

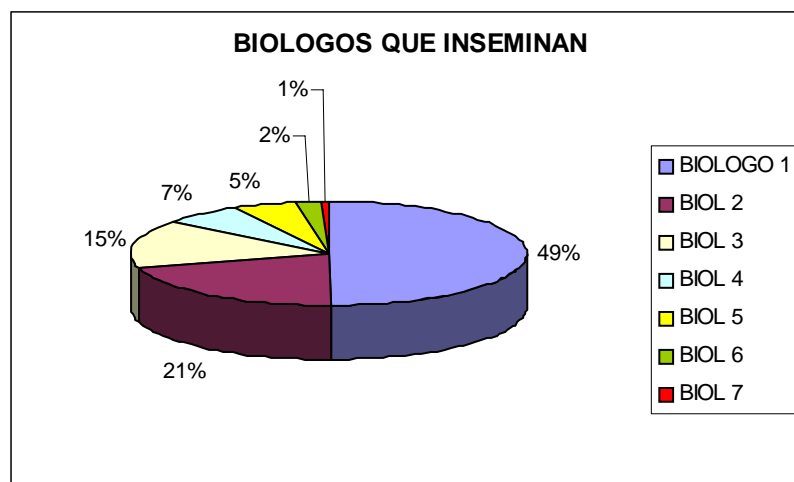
	CICLOS	MEDIA \pm DT	%
INSEMINADOS	400	7,37 \pm 3,67	-
2 PN y 2 CP	400	4,7 \pm 2,67	63,75
EMBRIONES	400	4,06 \pm 2,22	86,38
CALIDAD 1	400	0,84 \pm 1,03	20,81
CALIDAD 2	400	1,68 \pm 1,22	41,38
CALIDAD 3	400	1,49 \pm 1,55	36,76
CALIDAD 4	400	0,04 \pm 0,27	1,05
EMBR. TRF.	400	2,03 \pm 0,49	50,06
TRF.CALIDAD 1	400	0,74 \pm 0,8	36,29
TRF.CALIDAD 2	400	0,88 \pm 0,73	43,54
TRF.CALIDAD 3	400	0,39 \pm 0,67	19,43
TRF.CALIDAD 4	400	0,1 \pm 0,12	0,74

Tabla 13: Datos de variables estudiadas sólo en el grupo de las embarazadas

IV.1.A.14.- Biólogo

El biólogo que insemina es otro dato más, aunque en la mayoría de los ciclos de microinyección en el proceso intervenían más de uno, pues parte de los ovocitos eran inyectados por un biólogo y otra parte por el otro. Generalmente siempre hay dos o tres biólogos que realizan la mayoría de los procesos de fecundación y el resto interviene en otras partes del ciclo, como la obtención de ovocitos en la punción folicular, el decumulado previo de ovocitos que se van a inyectar, etc.

Además hay que tener en cuenta que en los periodos vacacionales o de fin de semana el biólogo que inyecte quizás no sea el que acostumbra a hacerlo; de todas formas todo embriólogo que tenga la responsabilidad de realizar una microinyección espermática o una fecundación “in vitro” convencional ha pasado por una etapa de aprendizaje previa (“curva de aprendizaje”), siempre bajo la supervisión de un compañero más veterano. En total en la fecundación del grupo de embarazadas han intervenido siete biólogos, que se podrían numerar del 1 al 7 pudiendo obtenerse esta gráfica (número 22) con los porcentajes correspondientes:



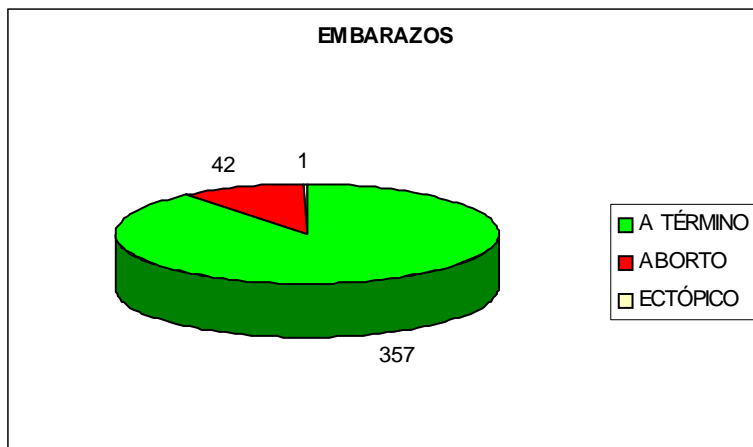
Gráfica 22: Biólogos que intervienen en la fecundación del grupo de embarazadas

IV.1.A.15.- Embarazos a Término y Abortos

Del total de las 400 pacientes embarazadas, no todas llegaron a término; hubo 42 abortos y un embarazo ectópico. Por tanto el porcentaje de llegada a término es del 89,25%, si bien es cierto que algunos de los fetos murieron al poco de nacer, bien por malformaciones o por inmadurez; también algunos de los abortos fueron voluntarios (IVE) porque eran incompatibles con la vida. Destaca el gran porcentaje de embarazos múltiples en este grupo, más de la quinta parte (21,28%), con los correspondientes riesgos que ello supone tanto para la madre como para los fetos. Los datos se resumen en las tabla 14 y 15, y en la gráficas 23 y 24.

Embarazos	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
A Término	357	89,25
Aborto	42	10,5
Ectópico	1	0,25
TOTAL	400	100

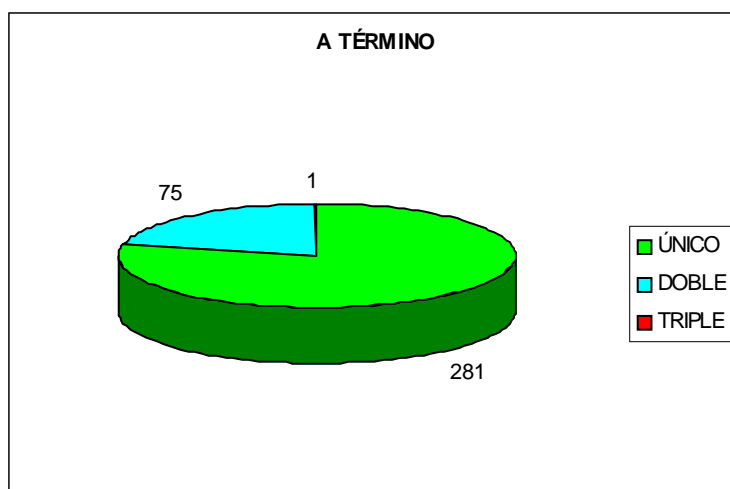
Tabla 14: Proporción de embarazos



Gráfica 23: Diagrama sectorial de la proporción de embarazos

A Término	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Único	281	78,71
Doble	75	21
Triple	1	0,28
TOTAL	357	99,9

Tabla 15: Proporción de embarazos a término

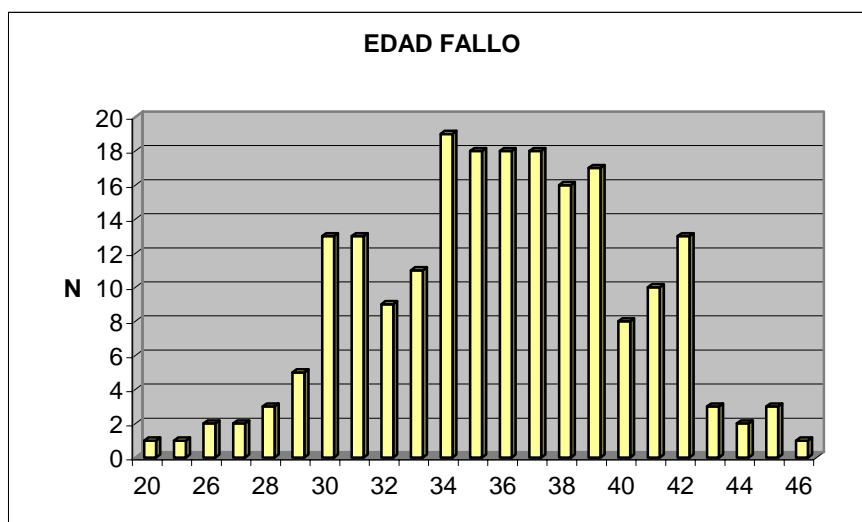


Gráfica 24: Proporción de embarazos a término

IV.1.B.- GRUPO CON FALLO DE FECUNDACIÓN

IV.1.B.1.- Edad

La edad media del grupo con fallo de fecundación es de $35,71 \pm 4,44$ años, variando el rango entre los 20 y los 46 años. El valor que más se repite o moda es de 34 años (19 veces, un 9,2%). En el grupo con fallo de fecundación hay 91 pacientes añosas, con 37 ó mas años de edad, lo que supone un 44,17% del total. La gráfica 25 muestra la distribución de frecuencias:



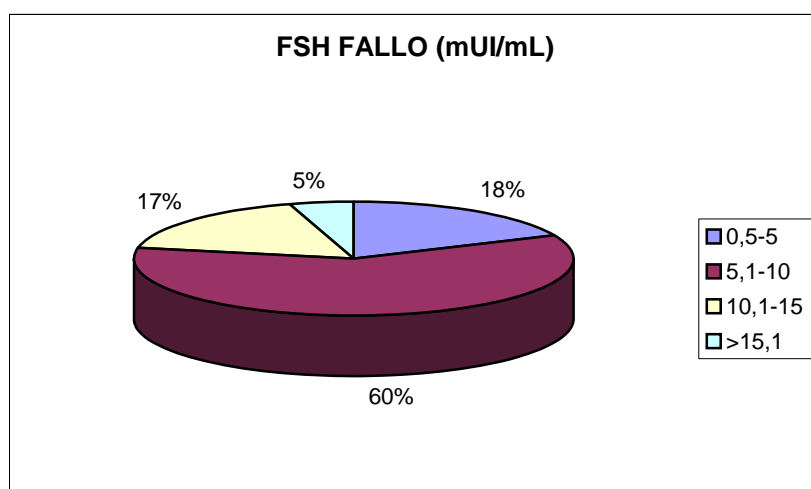
Gráfica 25: Frecuencia de edades del grupo con fallo de fecundación (fallo)

IV.1.B.2.- FSH

La medición media de la FSH es de $8,18 \pm 3,95$ mUI/ml. Si se considera que a partir de 10 mUI/ml la FSH es alta, hay un total de 48 pacientes en el grupo con fallo que igualan o superan esa medida, lo que supone un 23,3% del total. La tabla de frecuencias (tabla 16), y su gráfica (gráfica 26), distribuida por cuartiles de edad, es la siguiente:

FSH (mUI/ml)	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
0,5-5	38	18,45
5,1-10	123	59,7
10,1-15	35	17
>15,1	10	4,85
TOTAL	206	100

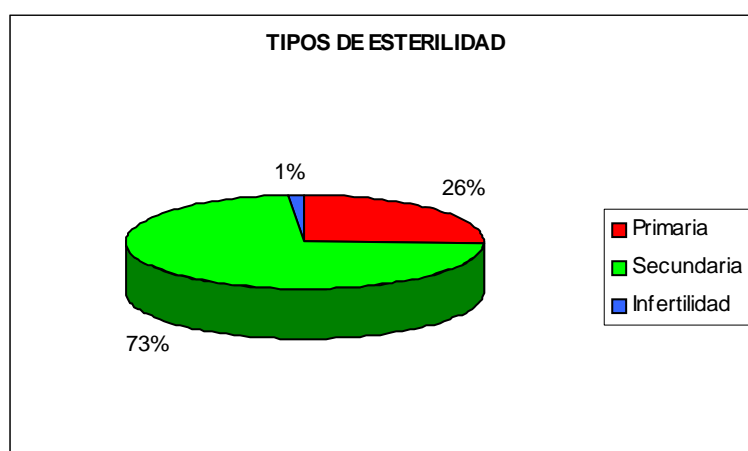
Tabla 16: FSH del grupo con fallo dividida en rangos



Gráfica 26: FSH del grupo con fallo dividida en rangos

IV.1.B.3.- Esterilidad

Se habla de esterilidad primaria cuando no se ha conseguido embarazo tras un año de relaciones sin poner medios. En el caso de esterilidad secundaria, un año sin conseguir una segunda gestación, pero con embarazo a término, también se han incluido embarazos en ciclos anteriores, utilizando una técnica de reproducción asistida, ya sea o no en nuestro centro. En el caso de infertilidad no se ha conseguido un embarazo a término, después de quedarse embarazada en al menos dos ocasiones. No se distingue entre infertilidad primaria y secundaria. La distribución de frecuencias se muestra en la gráfica 27 y la tabla 17:



Gráfica 27: Distribución del tipo de esterilidad en el grupo con fallo de fecundación

Esterilidad	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Primaria	53	25,73
Secundaria	150	72,81
Infertilidad	3	1,46
TOTAL	206	100

Tabla 17: Distribución del tipo de esterilidad en el grupo con fallo de fecundación

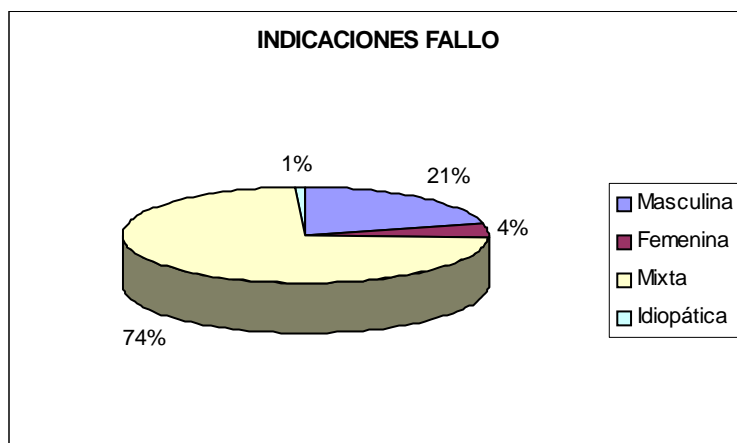
Los datos apuntan a que tan sólo la cuarta parte de las pacientes que presentan un fallo total de fecundación en este estudio nunca se habían quedado embarazadas antes, mientras que el resto ha conseguido un mínimo de un embarazo, ya sea por sus propios medios o con ayuda de la reproducción asistida.

IV.1.B.4.- Indicación

Los tipos de indicación quedan reflejados en la siguiente tabla:

Indicación	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Masculina	44	21,36
Femenina	9	4,37
Mixta	151	73,3
Idiopática	2	0,97
TOTAL	206	100

Tabla 18: Indicaciones del grupo con fallo



Gráfica 28: Indicaciones del grupo con fallo

IV.1.B.5.- Indicaciones Femeninas

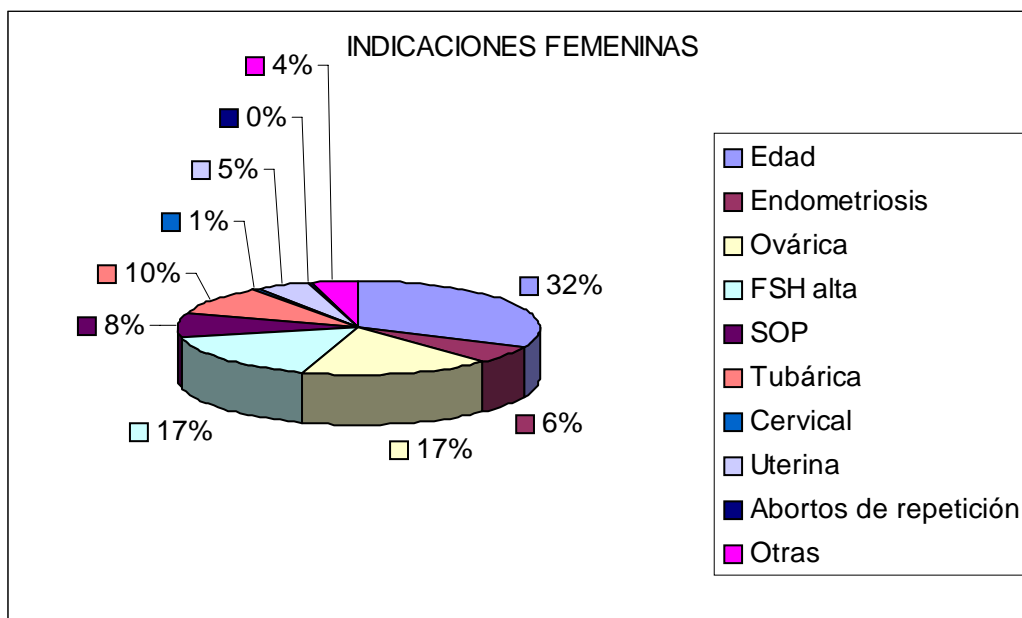
Se encuentran en 160 pacientes, entre indicaciones femeninas y mixtas, lo que representa un 77,67% con respecto al resto de factores (masculino, idiopático). En

varias pacientes (un total de 86, un 53,75%) hay más de una indicación, lo que hace un total de 287 antecedentes femeninos diferentes. Existen 50 mujeres (31,25%) con 2; 31 (19,37%) con 3; y 5 pacientes (3,12%) hasta con 4 indicaciones distintas.

Lo que en el laboratorio se considera como factor “ovocitario”, es decir, ciclos con 3 ó menos ovocitos, o con una gran proporción de ovocitos atrésicos o inmaduros, aquí se considera, en algunos casos, como factor ovárico. La tabla 19 y gráfica 29 resume las principales indicaciones femeninas:

Indicación Femenina	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Edad	91	31,71
Endometriosis	18	6,27
Ovárica	49	17,07
FSH alta	48	16,72
SOP	24	8,36
Tubárica	28	9,76
Cervical	3	1,05
Uterina	13	4,53
Abortos de repetición	1	0,35
Otras	12	4,18
TOTAL	287	100

Tabla 19: Indicaciones femeninas



Gráfica 29: Principales indicaciones femeninas del grupo con fallo

IV.1.B.6.- Indicaciones Masculinas

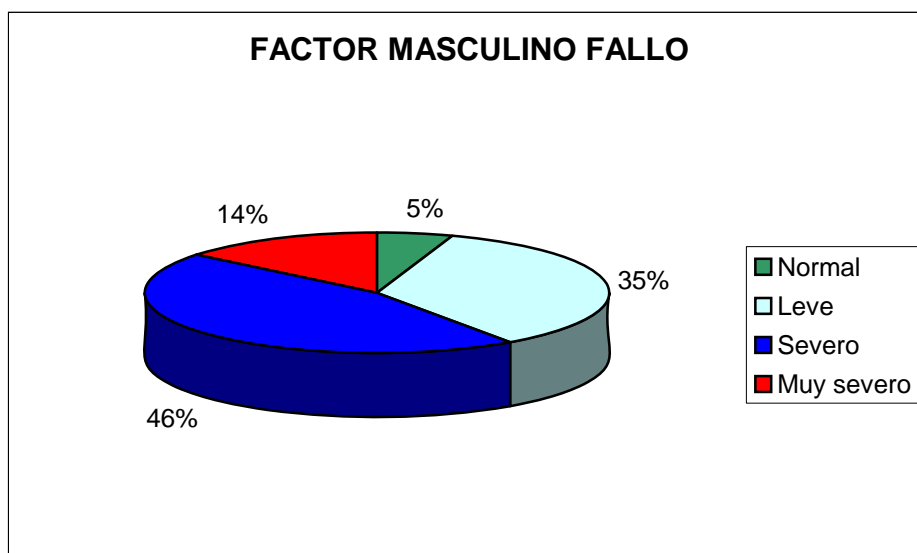
a.- Calidad seminal: El factor masculino afecta a 195 parejas (el 94,66%) del grupo con fallo de fecundación entre indicaciones masculinas y mixtas. Los distintos diagnósticos ya quedaron establecidos anteriormente, y hay que añadir el de:

.- Cripto: Criptozoospermia. No hay espermatozoides en el eyaculado. Sólo se observan después de centrifugar la muestra. Es, por tanto, un diagnóstico de OATN muy severa.

Como ya se comentó con anterioridad, dado el gran número de indicaciones masculinas diferentes, éstas se pueden agrupar en base a su grado de severidad, resultando la tabla 20:

Semen	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Normal	11	5,34
Leve	72	34,95
Severo	94	45,63
Muy severo	29	14,08
TOTAL	206	100

Tabla 20: Calidad seminal en base al grado de severidad



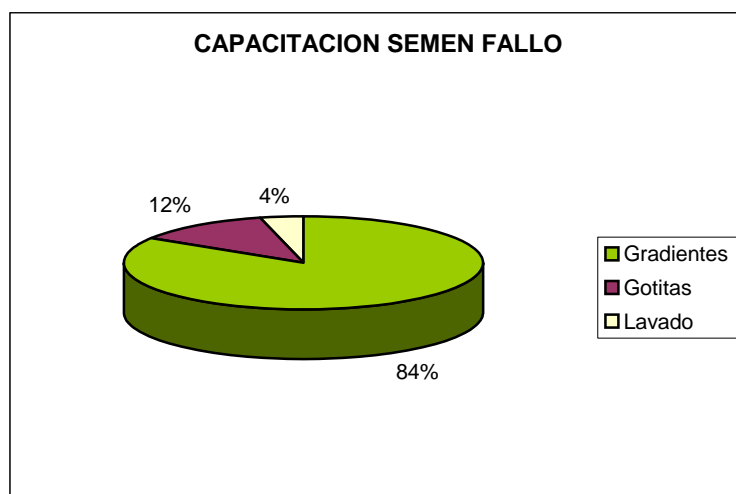
Gráfica 30: Calidad seminal en base al grado de severidad

b.- Procedencia de la muestra (Tabla 21)

Procedencia	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
En Fresco	182	88,35
Congelado	24	11,65
TOTAL	206	100

Tabla 21: Procedencia de la muestra del grupo con fallo

c.- Capacitación de la muestra (Gráfica 31)

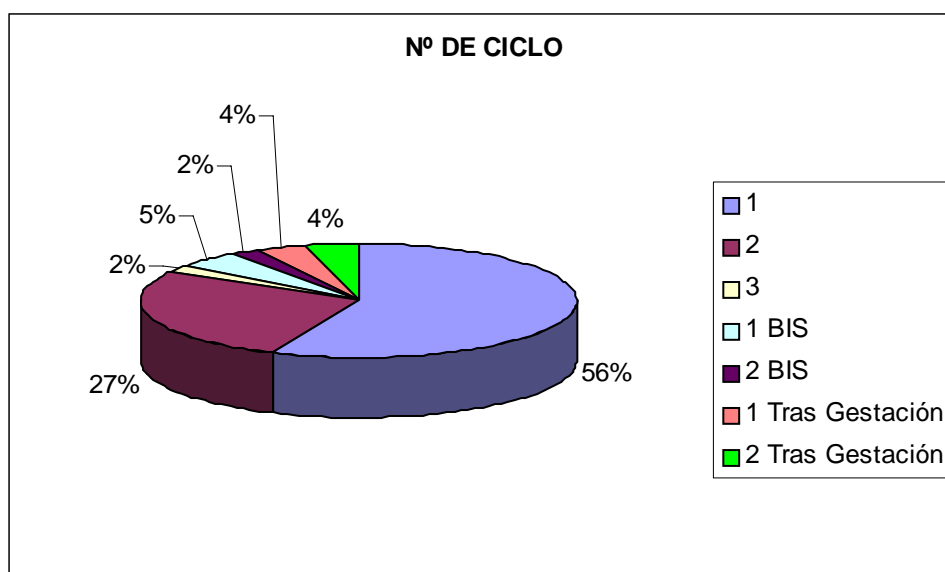


Gráfica 31: Capacitación de la muestra del grupo con fallo de fecundación

Las muestras que han requerido de una determinación previa de PCR se reparten de la siguiente manera: HIV: 1 (12,5%); HIV+HCV: 2 (25%); HCV: 3 (37,5%); HBV: 1 (12,5%) y HCV+HBV: 1 (12,5%).

IV.1.B.7.- Número de ciclo

Se contabilizan los ciclos realizados en la clínica Ginefiv. En los ciclos “Bis” ya se ha producido una cancelación anterior, ya sea por baja respuesta, por crecimiento anómalo de los folículos o por cualquier otra circunstancia (gráfica 32).



Gráfica 32: Número de ciclo del grupo con fallo de fecundación

IV.1.B.8.- Técnicas de Reproducción Asistida (T.R.A.)

En el grupo con fallo de fecundación quedan repartidas de la siguiente manera (tabla 22):

T.R.A.	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
ICSI	150	72,82
MIXTA	5	2,43
FIV	41	19,9
TESE	10	4,85
TOTAL	206	100

Tabla 22: Distribución de T.R.A. en el grupo con fallo

En los fallos de FIV (41 casos) se observaban dos parámetros del semen: la cantidad de espermatozoides adheridos a la zona pelúcida del ovocito (muchos, pocos o ninguno) y la calidad de dicho semen, capacitado, pasadas 24 horas (buena, regular o mala). Los datos recogidos se pueden resumir en estas tablas (23 y 24):

Esptz-ZP	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Muchos	15	36,59
Pocos	16	39,02
Ninguno	10	24,39
TOTAL	41	100

Semen 24 hs	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Bien	29	70,73
Regular	8	19,51
Mal	4	9,76
TOTAL	41	100

Tablas 23 y 24: Parámetros observados del semen en FIV tras 24 horas en el grupo con fallo

Estos datos nos pueden llevar a la conclusión de que alguno fallos de fecundación tras FIV convencional pueden ser debidos a problemas en la interacción espermatozoide-zona pelúcida, como sucede hasta en 26 casos (el 63,41%), pues ciertos defectos en la ZP pueden impedir la penetración del espermatozoide en la misma.

En cuanto a la calidad del semen capacitado pasadas 24 horas, en la mayoría de los casos (70,73%) la muestra presentaba una buena calidad en cuanto a porcentaje de gametos con buena motilidad, siendo sólo un 29,27% los casos con escaso o nulo movimiento, coincidiendo en un gran tanto por ciento con los ciclos en donde se veía poca o ninguna adhesión de espermatozoides con la ZP (en 11 de los 12 casos), haciendo dudar de si realmente no ha habido fecundación por la mala supervivencia espermática a las 24 horas (a pesar de que el varón, por protocolo, ha superado recientemente un Test de Supervivencia Espermática o Test de Capacitación) o de si habría que hablar de lo expuesto anteriormente: Problemas entre espermatozoide y ZP.

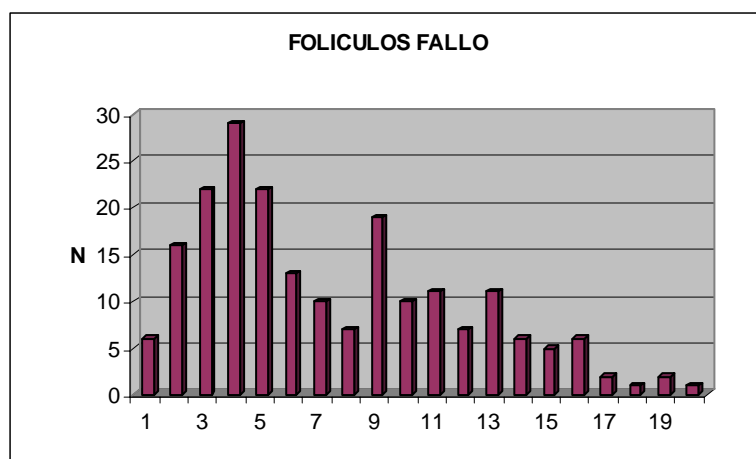
En los casos de ICSI se podría contabilizar cómo ha ido la técnica: si el ovocito ha realizado el denominado “cono de inyección” de forma satisfactoria o, por el contrario, la membrana se ha roto casi sin esfuerzo (“membrana frágil”) o ha costado un poco más en romperse (“membrana dura”). Hay hasta 36 casos de un total de 160 (no se contabilizan las técnicas mixtas), en donde los ovocitos no forman dicho cono (22,5%), atravesando la membrana con la micropipeta antes de lo debido, pues en casi todos los casos se trataba de “membranas frágiles”. Es decir, que en más de una quinta parte de los ciclos los ovocitos, en general, no se comportan de forma normal ante el proceso de microinyección.

Todos estos datos son estudiados para tratar de dar con una explicación del por qué ha habido un fallo de fecundación en FIV (interacción esptz-ZP y calidad espermática a las 24 horas) o en ICSI (técnica de la microinyección), aunque ya se intenta protocolizar en una situación así el estudio del semen a nivel genético. Actualmente hay muchos más estudios de FISH alterado que en el periodo estudiado, en donde se contabilizaban más casos de meiosis, pero se ha podido recabar alguna información al respecto.

Sólo hay 5 varones (2,43%) en los que se analizó el semen mediante un FISH, tras un fallo de fecundación, obteniéndose un FISH alterado en 2 de ellos (40%); sin embargo en los casos con estudio de meiosis (11 en total, un 5,34%), sólo 1 era normal (9,08%), siendo el 90,91% restante alterada, lo que podría provocar el fallo de fecundación por parte del espermatozoide. Las parejas en donde hay una alteración genética del semen tienen como posible solución el banco de semen, un diagnóstico genético preimplantacional o intentar repetir el ciclo sabiendo de las escasas probabilidades de éxito.

IV.1.B.9.- Folículos

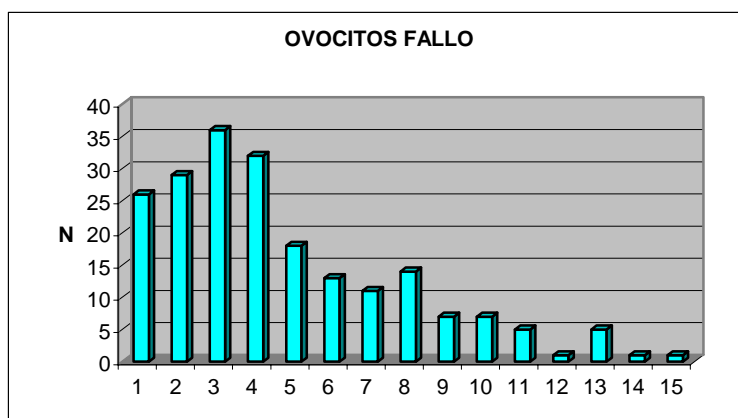
El número total de folículos puncionables mayores de 1,3 cm en el grupo con fallo de fecundación es de 1.518, siendo la media de $7,37 \pm 4,47$ folículos/ciclo y el rango varía entre 1 y 20 folículos. La moda es de 4 (29 veces, un 14,1% del total) (Gráfica 33).



Gráfica 33: Frecuencia del número de folículos del grupo con fallo de fecundación

IV.1.B.10.- Ovocitos

El número total de ovocitos obtenidos después de la punción transvaginal ecoguiada en el grupo con fallo de fecundación es de 971, y la media es de $4,71 \pm 3,15$ ovocitos/ciclo, siendo el rango entre 1 y 15 ovocitos y la moda de 3 (36 veces, un 17,5%). El porcentaje de ovocitos obtenidos con respecto a los folículos medidos es del 63,97%. Su correspondiente gráfica de frecuencias viene a continuación (gráfica 34):



Gráfica 34: Frecuencia del número de ovocitos del grupo con fallo de fecundación

IV.1.B.11.- Ovocitos Atrésicos

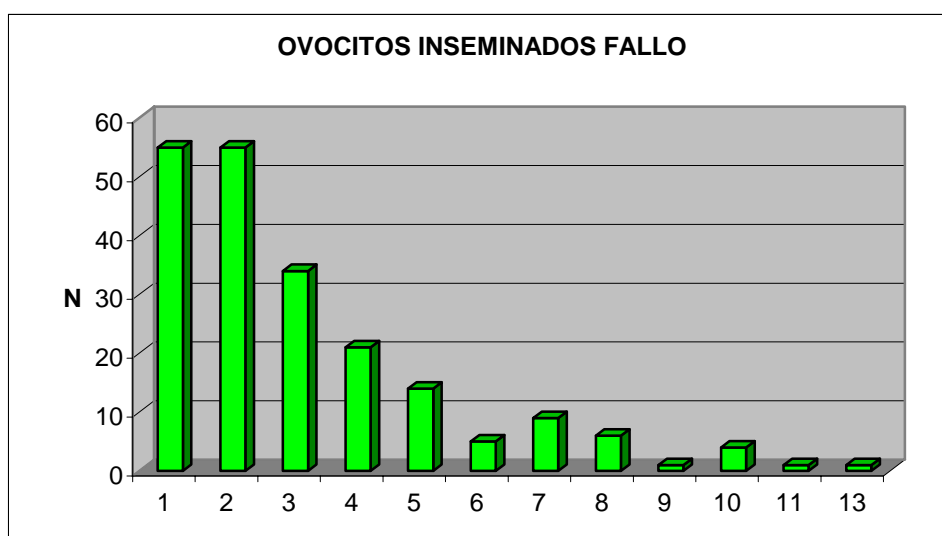
El número total de ovocitos atrésicos del grupo con fallo de fecundación es de 108, siendo la media de $0,52 \pm 0,95$, con un rango entre 0 y 7; la moda es 0 (133 veces, un 64,6%). El porcentaje de ovocitos atrésicos con respecto al total de ovocitos obtenidos en dicho grupo es del 11,12%. (Tabla 25)

Atrésicos	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
0	133	64,6
1	54	26,2
2	11	5,3
3	5	2,4
5	2	1
7	1	0,5
TOTAL	206	100

Tabla 25: Frecuencia de los ovocitos atrésicos del grupo con fallo

IV.1.B.12.- Ovocitos Inseminados

Los ovocitos inseminados o fecundados representan un 65,39% del total de ovocitos del grupo con fallo de fecundación, es decir, 635, con una media de $3,08 \pm 2,3$ ovocitos inseminados/ciclo. El rango se sitúa entre 1 y 13 y la moda es de 1 y 2 (55 veces cada valor, un 26,7%). Estos datos indican que nada menos que en un 53,4% de los ciclos con un fallo de fecundación sólo se han podido fecundar 1 ó 2 ovocitos, y si sumamos también los casos en los que se inseminan 3 ovocitos el porcentaje se sitúa en el 69,9%. (Gráfica 35)



Gráfica 35: Ovocitos inseminados en el grupo con fallo de fecundación

IV.1.B.13.- Datos grupo con fallo de fecundación por T.R.A.

La siguiente tabla es un resumen de los datos vistos hasta ahora del grupo con fallo de fecundación. Después se dividirán según las técnicas, como en el anterior grupo, es decir, los de microinyección y TESE+ICSI por un lado (grupo ICSI) y los de FIV convencional y los de mixta por el otro (grupo FIV) (Tablas 26 y 27).

	CICLOS	MEDIA \pm DT	MODA	SUMA	%	MINIMO	MAXIMO	RANGO
EDAD	206	35,71 \pm 4,44	34	-	-	20	46	26
FSH (mUI/ml)	206	8,18 \pm 3,95	9	-	-	1,3	30	28,8
FOLICULOS	206	7,37 \pm 4,47	4	1.518	-	1	20	19
OVOCITOS	206	4,71 \pm 3,15	3	971	63,97	1	15	14
ATRESICOS	206	0,52 \pm 0,95	0	108	11,12	0	7	7
INSEM	206	3,08 \pm 2,3	1 Y 2	635	65,39	1	13	12

Tabla 26: Resumen de datos del grupo con fallo de fecundación

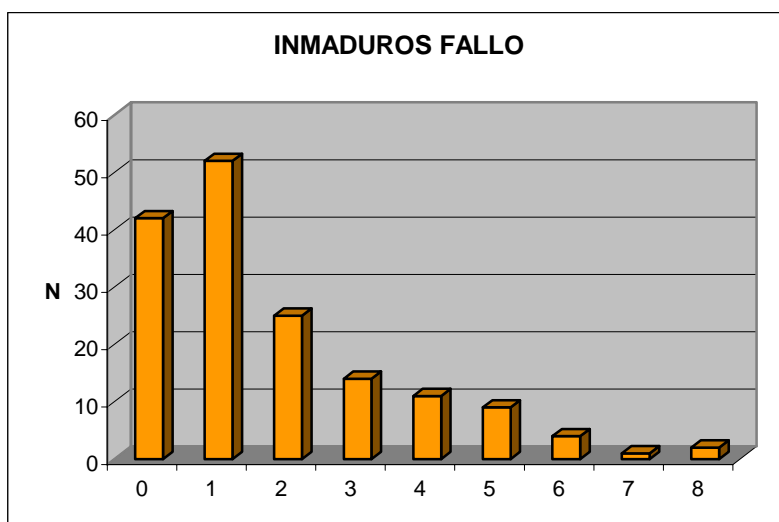
	CICLOS	MEDIA \pm DT	%
FOLIC ICSI	160	7,32 \pm 4,54	77,14
OVOC ICSI	160	4,75 \pm 3,14	78,27
ATR ICSI	160	0,51 \pm 0,87	10,66
INYECT ICSI	160	2,82 \pm 1,95	59,34
FOLIC FIV	46	7,54 \pm 4,28	22,86
OVOC FIV	46	4,59 \pm 3,24	21,73
ATR FIV	46	0,59 \pm 1,2	12,8
INSEM FIV	46	4 \pm 3,1	87,2

Tabla 27: Resumen de datos del grupo con fallo divididos por T.R.A.

a.- Datos grupo FIV: (Tabla 27).

b.- Datos grupo ICSI

1.- Ovocitos Inmaduros: El total de ovocitos inmaduros es de 280 (141 en M-I y 139 en P-I), lo que supone un 36,84% del total de ovocitos de ICSI y una media de $1,75 \pm 1,79$ ovocitos inmaduros/ciclo. El rango varía entre 0 y 8 y la moda es 1, que se repite 52 veces, un 32,5%. (Gráfica 36)



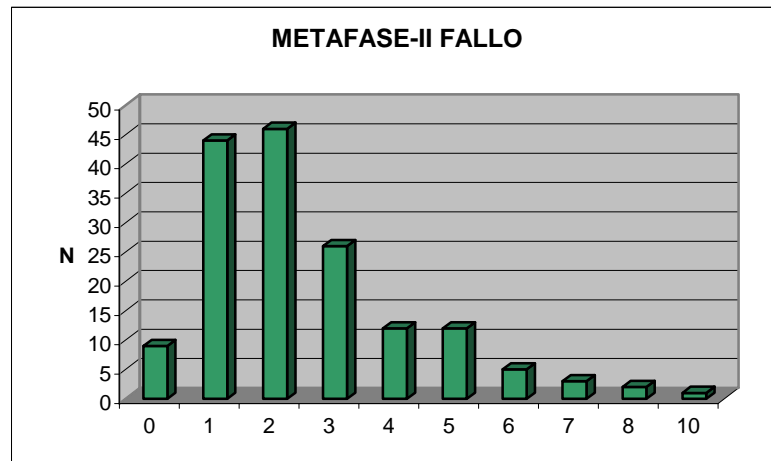
Gráfica 36: Ovocitos inmaduros del grupo ICSI-fallo

2.- Ovocitos Madurados: Son un total de 52 ovocitos, con una media de $0,32 \pm 0,74$, lo que supone un 18,57% del total de ovocitos que en principio estaban inmaduros. La moda es 0 (126 veces, un 78,8%) y el rango se sitúa entre 0 y 4. (Tabla 28)

Madurados	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
0	126	78,8
1	23	14,4
2	5	3,1
3	5	3,1
4	1	0,6
TOTAL	160	100

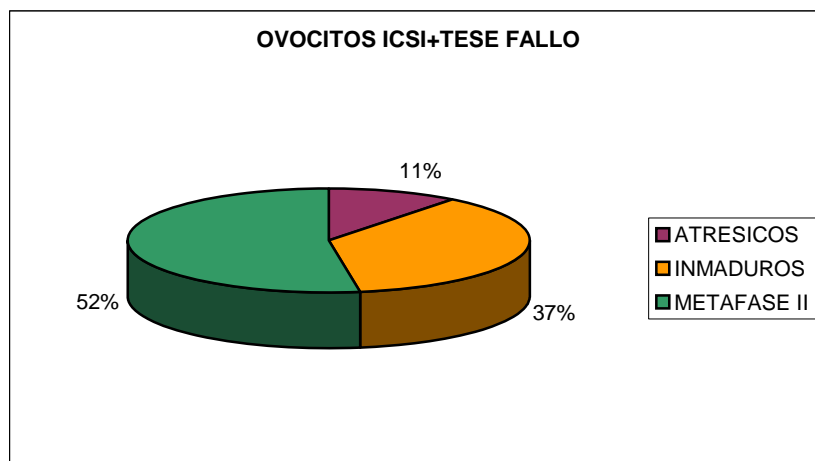
Tabla 28: Ovocitos madurados del grupo ICSI-fallo

3.- Ovocitos Maduros o Metafase-II: Suponen un total de 399 ovocitos (el 52,50% del total de ovocitos de ICSI), con una media de $2,49 \pm 1,8$ ovocitos maduros/ciclo y un rango entre 0 y 10. La moda es 2 (46 veces se repite, un 28,8%). Su tabla de frecuencias indica que hasta en un 78,2% de los ciclos sólo había como máximo 3 ovocitos maduros en el momento de la decumulación (Gráfica 37).



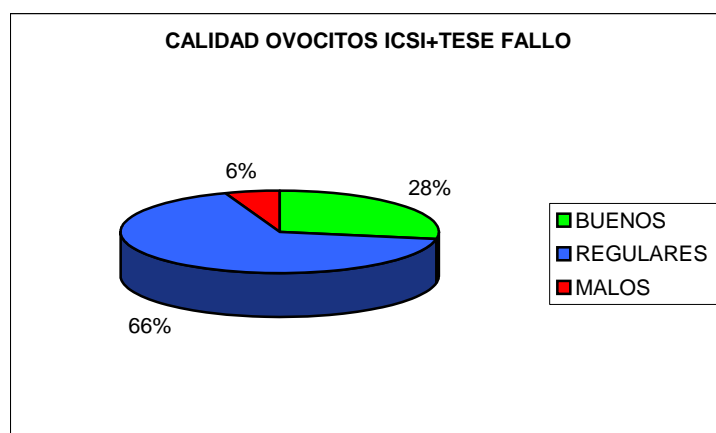
Gráfica 37: Ovocitos maduros (M-II) en el grupo ICSI-fallo

Los ovocitos del grupo ICSI-fallo se podrían dividir en tres grandes conjuntos, tal y como se hizo anteriormente en el grupo ICSI-embarazadas: maduros, atrésicos e inmaduros, siendo el resultado el siguiente (Gráfica 38):



Gráfica 38: Clasificación de ovocitos de la ICSI en el grupo con fallo

4.- Calidad Ovocitaria: La gráfica 39 de los ovocitos según su calidad sería la que viene a continuación:



Gráfica 39: Clasificación de los ovocitos de la ICSI según su calidad

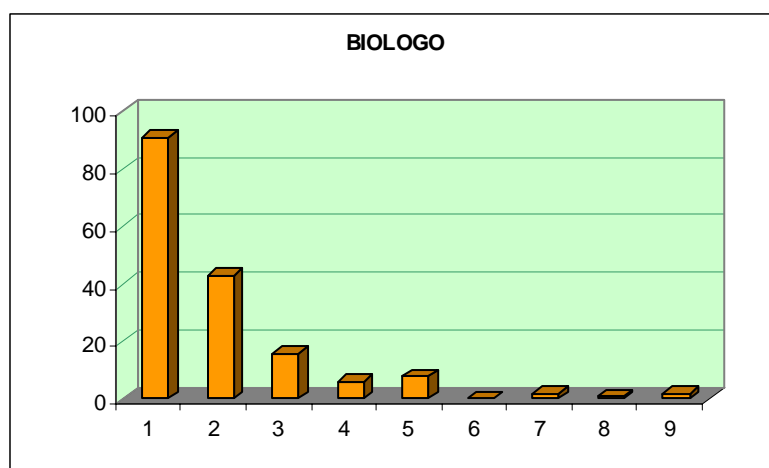
Los datos referentes a los ovocitos buenos, regulares y malos se encuentran en la siguiente tabla 29:

	CICLOS	MEDIA \pm DT	MODA	SUMA	%	MINIMO	MAXIMO	RANGO
BUENOS	160	0,78 \pm 1,38	0	125	27,72	0	10	10
REGULARES	160	1,88 \pm 1,73	1	301	66,74	0	8	8
MALOS	160	0,16 \pm 0,5	0	25	5,54	0	3	3

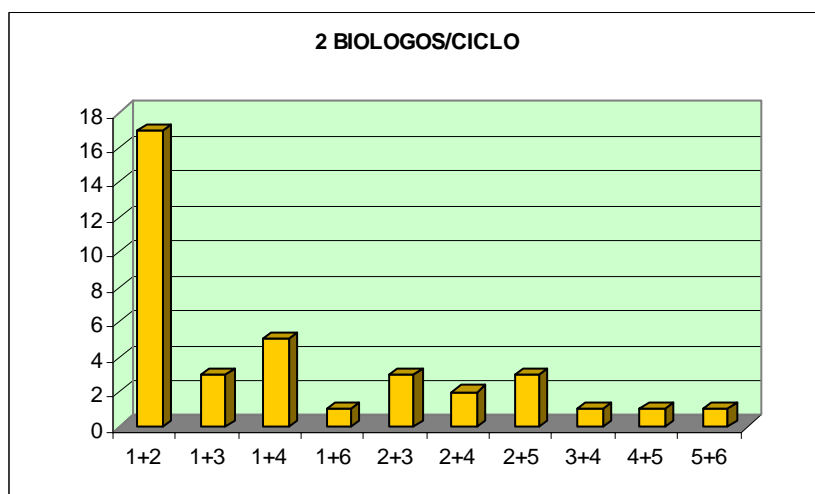
Tabla 29: Datos de los ovocitos de ICSI según calidad

IV.1.B.14.- Biólogo

El biólogo que insemina es otro dato más, aunque en la mayoría de los ciclos de microinyección en el proceso intervenían más de uno, pues parte de los ovocitos eran inyectados por un biólogo y otra parte por el otro. En 169 ciclos (un 82,04%) sólo firma un biólogo como el que realiza el proceso de fecundación, habiendo un total de 9 diferentes, mientras que en el resto (17,96%) hay dos personas distintas. Los ciclos inseminados por la combinación de los distintos biólogos se clasifica de la siguiente manera, aunque como ya quedó claro anteriormente la mayoría de los casos, y en esto se coincide casi con el grupo de embarazadas, la fecundación es realizada por pocos biólogos.



Gráficas 40 y 41: Ciclos fecundados por 1 y 2 biólogos



IV.1.B.15.- Ciclos anteriores al fallo de fecundación

El total de ciclos realizados anteriormente en la clínica Ginefiv a estas pacientes con fallo completo de fecundación en ciclos de FIV/ICSI se ha contabilizado de la siguiente manera: En 80 parejas (el 38,83% del total del grupo con fallo) se han realizado 97 ciclos (1,21 ciclos/paciente), con 598 ovocitos obtenidos (6,16%) de los que se pudieron fecundar 434 (72,58%), con el resultado de 193 embriones en 2 PN y 2 CP en D+1 (44,47%). El día de la transferencia quedaban 179 embriones viables (92,75%), pues entre embriones parados (5,18%) y no viables (2,07%) contabilizaban el resto. Estos resultados se resumen en la siguiente tabla:

	Ciclos	Ovoc.	Atrés.	Fecund.	2 PN 2 CP	3 PN	E.no viables	E.parados	E.viables
Nº	97	598	44	434	193	14	4	10	179
Pac.	80	80	24	80	73	11	2	7	73
%	38,83	6,16	7,36	72,58	44,47	3,23	2,07	5,18	92,75

Tabla 30: Resultados de los ciclos anteriores en la clínica Ginefiv del grupo con fallo de fecundación

Los embriones viables se podrían clasificar en las cuatro categorías, habiendo 26 embriones de la 1ª (14,53%), 74 de la 2ª (41,34%), 75 de la 3ª (41,9%) y 4 de la 4ª (2,23%). Se transfirieron un total de 133 embriones (el 74,3%) en 65 señoras (81,25%). En el resto de pacientes (15) no hubo transferencia por varios motivos, principalmente por riesgo de hiperestimulación ovárica (en 6, un 40%), por fallo previo (otros 6, el 40%), por parada embrionaria (1 caso, el 6,67%) y otros (2, el 13,33%).

Se contabilizaron un total de 17 embarazos (26,15%): Una señora se embarazó en dos ocasiones y otra lo hizo en un ciclo de descongelación de embriones. Sin embargo el porcentaje de abortos fue muy alto: un 64,7%, llegando a término sólo 6 niños (35,3%). Es decir, que de un total de 97 ciclos iniciados en el grupo con fallos de fecundación antes de dicho fallo, sólo en 6 se ha conseguido el éxito de un niño sano en casa, lo que supone un 6,19%.

Además de los ciclos cuyos datos se han visto reflejados, algunas parejas también habían realizado tratamientos de FIV/ICSI en otros centros (16, un 7,77%), contabilizando más de 44 (casi 3 ciclos/paciente), con resultados muy diversos: buenos embriones, ovocitos inmaduros, fallos de fecundación, cancelación por bajas respuestas, etc; incluso se da el caso curioso de una paciente que hizo un ciclo de ovodonación, aunque, por supuesto, no sabemos el resultado del mismo.

En cuanto a ciclos de inseminación artificial conyugal (IAC), los datos son los siguientes: un total de 49 pacientes (23,79%) se han realizado algún ciclo previo, 13 (26,53%) en otros centros (más de 30 ciclos conocidos) y 36 (73,47%) en la clínica Ginefiv, con un total de 109 tratamientos previos de IAC antes de pasar a FIV. El resultado en cuanto a embarazos es realmente pobre: sólo 1 y acabó en aborto. El número de ciclos por pacientes se puede representar en la siguiente tabla:

Número de IAC	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
1	4	11,11
2	10	27,78
3	10	27,78
4	7	19,44
5	4	11,11
7	1	2,78
TOTAL	36	100

Tabla 31: Número de IAC por paciente previa a ciclo de FIV en el grupo con fallo de fecundación

El estudio de los ciclos previos, tanto de IAC como de FIV/ICSI en los pacientes que han tenido un fallo de fecundación nos da una idea de la dificultad que presentan tanto en la consecución de un embarazo como en el éxito que conlleva el nacimiento de un niño con sus propios gametos. Hasta 34 parejas (un 16,5%) volverán a presentar un segundo fallo de fecundación, lo que plantearía la idea de cambiar algún gameto antes de iniciar otro tratamiento o de que hay algo más, a nivel genético, que imposibilita de alguna manera nuestro objetivo. De ahí la necesidad de ampliar estudios a nivel genético en el espermatozoide (FISH, fragmentación del ADN) en estos casos tan malos.

IV.1.B.16.- Ciclos posteriores al fallo de fecundación

De las 206 parejas estudiadas que presentaron un fallo de fecundación, un total de 80 no han vuelto a realizarse ningún ciclo posteriormente, lo que representa el 38,83%. De las 126 parejas restantes (61,17%), 124 se han realizado al menos un ciclo de FIV-ICSI, con datos actualizados hasta septiembre de 2.008; otra pareja no llegó a finalizarlo al cancelarse por baja respuesta y otra se hizo un ciclo de IAD. De las pacientes que no volvieron a realizar ningún ciclo se conoce de la existencia de al menos cuatro embarazos espontáneos (5%), de los que uno acabó en aborto y tres en gestaciones a término.

Los datos referidos a los diferentes ciclos realizados (propios, ovodonación, donación de semen o doble donación) a las pacientes que volvieron a intentarlo se resumen en las siguientes tablas (32 a 37), en donde no se cuentan ciclos de inseminación artificial conyugal o con semen de donante. Hasta 24 parejas de las 124

(19,35%) hicieron más de un tipo de ciclo diferente (por ejemplo, algún ciclo propio y otro de ovodonación).

	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
NO HAN VUELTO	80	38,83
ALGUN CICLO FIV/ICSI	124	60,19
CICLO CANCELADO	1	0,49
IAD	1	0,49
TOTAL	206	100

Tabla 32: Ciclos posteriores al fallo de fecundación

Propios	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
1	58	68,24
2	20	23,53
3	5	5,88
4	2	2,35
Total Parejas	85	100
Total Ciclos	121	

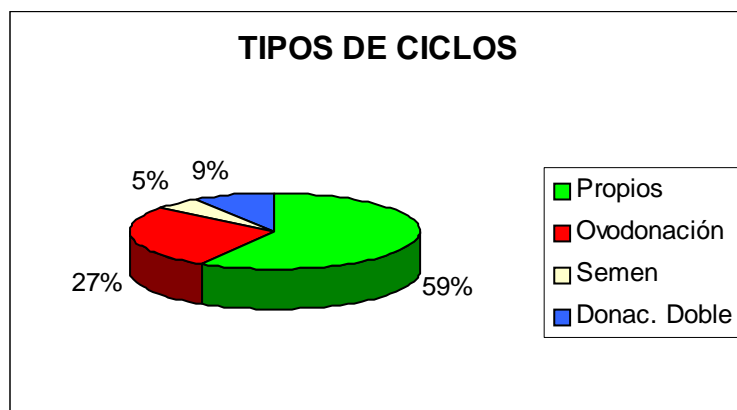
Donac.Semen	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
1	5	62,5
2	3	37,5
Total Parejas	8	100
Total Ciclos	11	

Ovodonación	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
1	27	65,85
2	13	31,71
3	1	2,44
Total Parejas	41	100
Total Ciclos	56	

Donac. Doble	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
1	14	87,5
2	1	6,25
3	1	6,25
Total Parejas	16	100
Total Ciclos	19	

Tablas 33 a 37 y gráfica 42: Distribución de tipos de ciclos posteriores al fallo de fecundación

Total ciclos	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Propios	121	58,45
Ovodonación	56	27,05
Semen	11	5,31
Donac. Doble	19	9,18
TOTAL	207	99,99



Del total de ciclos posteriores realizados por paciente se ha obtenido un número de 207, de los cuales ha habido transferencia en 178, lo que supone el 85,99%. La distribución del número de ciclos /paciente así como el de transfer/paciente y las causas de la no realización de la transferencia embrionaria se muestran en las tablas 38 a 40.

Ciclos/Pac.	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
1	73	58,87
2	32	25,81
3	10	8,06
4	6	4,84
5	2	1,61
6	1	0,81
Total Parejas	124	100
Total Ciclos	207	

Tablas 38 y 39: Número de ciclos/paciente y N° de transferencias/paciente

Transfer/Pac	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
0	18	14,52
1	60	48,39
2	30	24,19
3	9	7,26
4	5	4,03
5	1	0,81
6	1	0,81
Total Parejas	124	100,01
Total Ciclos	178	

CAUSAS NO TRF	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
No Fecundación	21	72,41
Punción en Blanco	1	3,45
Embriones anómalos	2	6,9
Ovocitos Inmaduros	1	3,45
Riesgo HPO	2	6,9
Otras causas	2	6,9
TOTAL	29	100,01

Tabla 40: Causas de no transferencia en los ciclos posteriores al fallo de fecundación

En cuanto a los embarazos conseguidos en dichos ciclos (β -hCG>5 mU/ml), estos son los datos, por número de ciclo, por paciente y por transferencia (tabla 41).

	BETA +	MUJER	CICLO	TRF
Frecuencia (n)	60	124	207	178
Porcentaje (%)	-	48,39	28,99	33,71

Tabla 41: Porcentaje de embarazo por paciente, ciclo y transfer en ciclos posteriores al fallo

Los embarazos, por tipo de ciclo, se resumen en la siguiente tabla (nº 42).

Total ciclos	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)	Nº ciclos	% Embarazo
Propios	28	46,67	121	23,14
Ovodonación	22	36,67	56	39,29
Semen	4	6,67	11	36,36
Donac. Doble	6	10	19	31,58
TOTAL	60	100,01	207	-

Tabla 42: Porcentaje de embarazo por tipo de ciclo en los ciclos posteriores al fallo

Según estos datos se han realizado más ciclos propios posteriores al fallo de fecundación, pero se ha conseguido un mejor resultado cuando se ha cambiado algún gameto: del 23,14% en ciclos propios a casi un 40% en ciclos de ovodonación y más del 35% en casos de donación de semen. El porcentaje de embarazo en ciclos con cambio de gameto se sitúa en el 37,21%, es decir, 32 gestaciones de 86 ciclos.

Comparando datos de embarazo entre las parejas que han seguido con sus propios gametos (23,14%) y las que no (37,21%), se encuentran diferencias estadísticamente significativas (p: 0,028).

Si contabilizásemos todos los embarazos conseguidos en ciclos posteriores, tanto en descongelaciones como en gestaciones espontáneas, el número total ascendería a 76 (el 61,29% de 124) en 65 mujeres (en al menos 10 mujeres se ha producido más de una gestación), como demuestra esta tabla (nº 43).

Embarazos	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Ciclos en fresco	60	78,95
Ciclos Dg	8	10,53
Esponáneos	8	10,53
TOTAL	76	100,01

Tabla 43: Todos los embarazos posteriores en las mujeres con fallo de fecundación

Con respecto a los embarazos bioquímicos, ectópicos y los abortos, se cuentan todas las gestaciones, y es en los ciclos propios en donde se produce un mayor número, pues el 39,29% (11/28) de los embarazos con gametos propios no llegan a término, comparado con el 21,88% (7/32) cuando hay un cambio de gameto. Cabe destacar la pérdida de un embarazo gemelar a la 29ª semana de gestación, por rotura prematura de

membranas, en un ciclo propio. De los 76 embarazos, 12 eran gemelares y uno triple, lo que supone el 15,79% y el 1,32% respectivamente. Los datos se representan en las tablas 44 y 45.

Resultado final	Propio	Ovodon	Semen	Doble	Dg	Espont
Bioquímicos	5	3	0	0	1	0
Abortos	6	2	1	0	2	1
Ectópicos	0	1	0	0	0	0
TOTAL	11	6	1	0	3	1

Tablas 44 y 45: Resultado final de todos los embarazos

Resultado final	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Bioquímicos	9	11,84
Abortos	12	15,79
Ectópicos	1	1,32
A término	54	71,05
TOTAL	76	100

En total, de las 206 parejas que han tenido un fallo de fecundación, ha habido posteriormente uno o más embarazos en 69 (33,50%), llegando a término en 57 de ellas (82,61%), que son las 54 de la tabla 60 y 3 de las parejas que no volvieron, consiguiéndose un total de 70 niños sanos en casa debido a los embarazos múltiples.

Si comparásemos tasa de evolución en ciclos propios (61,71%) con ciclos en donde ha habido un cambio de gameto (78,13%) no se encuentran diferencias estadísticamente significativas (p: 0,14).

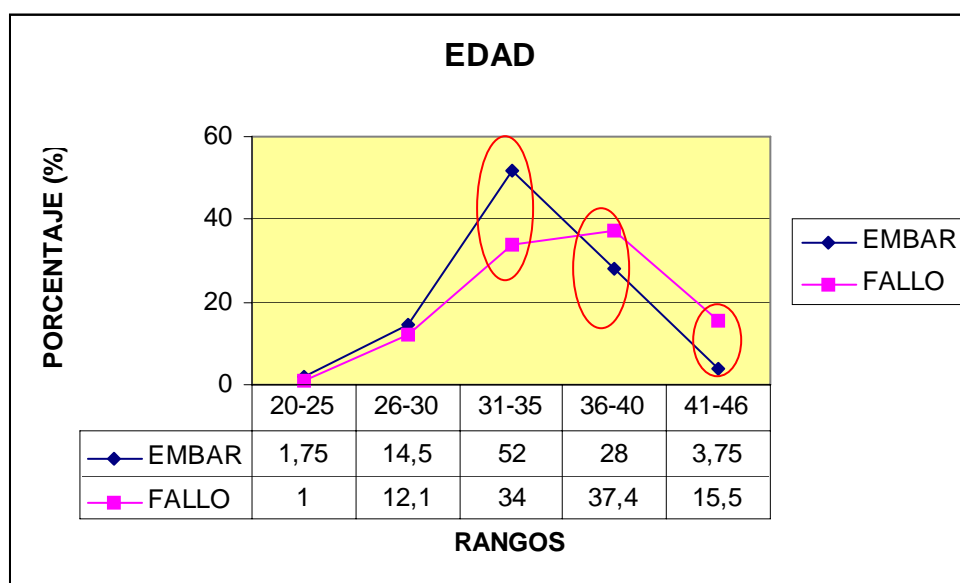
Podemos deducir una serie de resultados analizando ciclos posteriores en parejas que ya han tenido un fallo de fecundación previo. De los 121 ciclos realizados con los propios gametos, sólo en 21 se volvió a producir un segundo fallo de fecundación, lo que representa el 17,36%. Además si se cambia el gameto en un siguiente ciclo, tanto los porcentajes de embarazo como los de evolución son superiores, pero sólo se observan diferencias estadísticamente significativas en la tasa de gestación. Por tanto se podría concluir que en parejas que han tenido un fallo de fecundación se podría volver a recomendar un segundo ciclo con sus propios gametos, pues hasta el 82,64% de las parejas consiguen embriones, siempre y cuando quede descartado un resultado anómalo en el estudio genético del espermatozoide: FISH alterado o alta fragmentación del ADN espermático.

IV.2.- ESTADÍSTICA ANALÍTICA

Se compararon las siguientes variables entre los dos grupos, el de embarazadas y el que tuvo fallos de fecundación: Intrínsecas a la mujer: Edad y FSH al comienzo del ciclo. Relacionadas con la fecundidad: semen, en cuanto a calidad, tipo de capacitación y procedencia, e indicaciones femeninas, como por ejemplo la endometriosis. Relacionadas con la metodología: Tipo de T.R.A. Como variables intermedias: número de folículos (mayores de 1,3 cm), número de ovocitos, ovocitos atrésicos; inmaduros, madurados, maduros y calidad ovocitaria (sólo en los casos de microinyección); y número total de ovocitos inyectados o inseminados.

IV.2.1.- Edad

La gráfica 43 en donde se representan las edades por rangos en ambos grupos, embarazadas y con fallo de fecundación, y su correspondiente porcentaje de pacientes es la que viene a continuación, siendo los distintos rangos de edad: De 20 a 25 años, de 26 a 30, de 31 a 35, de 36 a 40 y de 41 a 46 años. Se trata de una estratificación por rango de quintiles. Las diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos por rangos se enmarcan en color rojo.



Gráfica 43: Edad en los grupos de embarazadas y con fallo de fecundación estratificada por quintiles.

EMBAR: grupo de embarazadas; FALLO: grupo con fallo de fecundación

La siguiente tabla 46 son ejemplos de estadísticos y resultados del contraste sobre comparación de dos medias con muestras independientes; en este caso la variable “Edad” del grupo de las mujeres embarazadas y del grupo de las parejas con fallo de fecundación.

Estadísticos de grupo

	Grupo	Ciclos	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
EDAD	Embar	400	33,9025	3,62019	,18101
	Fallo	206	35,7136	4,43715	,30915

Tabla 46a: Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						95% Intervalo de confianza para la diferencia	
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia		Inferior	Superior
EDAD	Se han asumido varianzas iguales	12,208	,001	-5,392	604	,000	-1,81109	,33588		-2,4707	-1,1514
	No se han asumido varianzas iguales			-5,055	348,59	,000	-1,81109	,35824		-2,5156	-1,1065

Tabla 46b: Estadísticos y resultados del contraste sobre comparación de las medias de la variable “Edad” en los grupos de embarazadas (Embar) y con fallo de fecundación (Fallo)

En cuanto al resultado del contraste de hipótesis sobre igualdad de varianzas (Prueba de Levene), el valor del estadístico de contraste (F) es 12,208 y el nivel crítico (Sig.) es 0,001. Como este nivel crítico es menor a 0,05, entonces se puede aceptar la hipótesis de varianzas diferentes. Tenemos que ver, por tanto, los resultados del contraste de comparación de medias que hay a continuación de “No se han asumido varianzas iguales”. El estadístico de contraste (t) es -5,055, los grados de libertad (gl) son: 348,59 y el nivel crítico, Sig. (bilateral), o “p-valor” es menor a 0,05, por lo que no se debe aceptar la hipótesis nula de que las medias son iguales. Es decir, que hay una diferencia estadísticamente significativa entre las medias en las edades de ambos grupos.

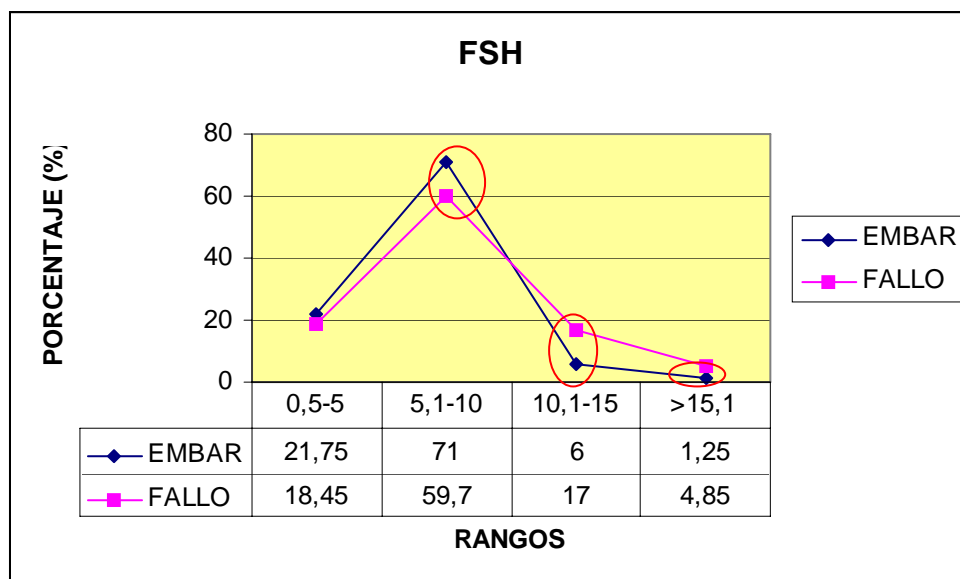
Además si hiciéramos una comparación entre las mujeres que hay con factor etario, es decir, con edades iguales o superiores a los 37 años, observamos que también es estadísticamente significativa dicha diferencia entre los dos grupos. En el grupo de

embarazadas las mujeres son 91 (22,75%), mientras que el grupo con fallo de fecundación, a pesar de ser el mismo número, 91, suponen el 44,17%. Utilizando un test de “Chi cuadrado”, el valor de “p” es aproximadamente de 0, que al ser menor de 0,05 (siempre con un intervalo de confianza del 95%), nos demuestra lo anteriormente expuesto.

En cuanto a la edad, por rangos, más de la mitad de las pacientes en el grupo gestante (52%) tienen una edad entre 31 y 35 años (en el grupo con fallo hay un 34%) y sólo un 3,75% tienen más de 40 años, porcentaje que alcanza hasta el 15,5% en el grupo con fallo de fecundación, en donde la mayoría de mujeres se sitúa en el rango de edad entre 36 y 40 años (37,4%). Es decir, no sólo hay diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los dos grupos, sino que además el porcentaje de pacientes añosas es claramente superior en el grupo con fallo de fecundación.

IV.2.2.- FSH

La comparación por rangos de la medición al comienzo del ciclo de la FSH en los dos grupos se puede estratificar en cuartiles. Las medidas son en mU/ml: De 0,5 a 5; de 5,1 a 10; de 10,1 a 15 y mayores de 15,1. La gráfica 44 es la siguiente:



Gráfica 44: FSH en mU/ml en ambos grupos, estratificadas por cuartiles. EMBAR: grupo de embarazadas; FALLO: grupo con fallo de fecundación

En cuanto al estudio de la diferencia de medias entre dos variables independientes se realiza la misma operación que ya fue comentada para la variable “edad” y que aquí se resume en la tabla 47.

	Grupo	Ciclos	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
FSH	Embar	400	6,9751	2,92836	,14642
	Fallo	206	8,1777	3,95173	,27533

Tabla 47a: Estadísticos de grupo

	Estadístico de contraste (F)	Nivel crítico (Sig.)	Estadístico de contraste (t)	Grados de libertad (gl)	Nivel crítico (Sig. Bilateral)	SIGNIFIC.
FSH	22,018	< 0,05	-3,856	324,029	<0,05	SI

Tabla 47b: Estadísticos y resultados del contraste sobre comparación de las medias de la variable “FSH” en los grupos de embarazadas (Embar) y con fallo de fecundación (Fallo)

Como el nivel crítico (Sig.) es menor de 0,05, se puede aceptar la hipótesis de desigualdad de varianzas en la Prueba de Levene. Los resultados del contraste de comparación de medias en “No se han asumido varianzas iguales” son los de la tabla, y como el nivel crítico (Sig. Bilateral) en este caso también es <0,05, existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de dichos grupos (“p-valor” < 0,05).

En cuanto al número de señoras con FSH alta, que se podría considerar a partir de 10 mU/ml, en el grupo gestante es de 29 de un total de 400 (7,25%) y en el grupo con fallo de fecundación de 48 de un total de 206 (23,3%). Si se hace una prueba de “Chi cuadrado” también se observan diferencias estadísticamente significativas entre ambos porcentajes (intervalo de confianza del 95% y significancia estadística con “p” <0,05), pues el valor de “p”: <0,05.

IV.2.3.- Indicación

Las indicaciones de ambos grupos (masculina, femenina, mixta e idiopática) son comparadas en la siguiente tabla 48, observándose diferencias estadísticamente significativas cuando se utiliza una prueba de “Chi cuadrado”, en todas ellas excepto en la idiopática o de origen desconocido. Es decir, hay un mayor porcentaje de casos en los

que prevalece sólo el factor masculino y sólo el factor femenino en el grupo gestante y de indicación mixta, en donde hay un factor o indicación de esterilidad en ambos miembros de la pareja en el grupo con fallo de fecundación.

	Embarazo	Embarazo	Fallo	Fallo		
Indicación	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)	p valor	SIGNIFIC.
Masculina	166	41,5	44	21,36	<0,05	SI
Femenina	40	10	9	4,37	0,016	SI
Mixta	184	46	151	73,3	<0,05	SI
Idiopática	10	2,5	2	0,97	0,2	NO
TOTAL	400	100	206	100		

Tabla 48: Comparación entre las indicaciones en los grupos con embarazo y con fallo de fecundación

IV.2.4.- Indicaciones Femeninas

Las principales indicaciones femeninas también son comparadas (Tabla 49), y como ya se comentó, puede que una paciente tenga más de una indicación así que el total se basa en el número de indicaciones femeninas y no en el de señoras. En el grupo gestante hay 313 indicaciones para 400 mujeres (0,78 indicac/mujer), mientras que en el grupo con fallo hay nada menos que 287 indicaciones para casi la mitad de pacientes (206, lo que hace un total de 1,39 indicac/mujer). Sólo en el caso del SOP hay diferencias estadísticamente significativas, aunque curiosamente es en el grupo de embarazadas en donde el porcentaje duplica al grupo con fallo de fecundación.

Indicación	Embarazo	Embarazado	Fallo	Fallo		
Femenina	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)	p valor	SIGNIFIC.
Edad	91	29,07	91	31,71	0,483	NO
Endometr.	23	7,35	18	6,27	0,601	NO
Ovárica	49	15,65	49	17,07	0,638	NO
FSH alta	37	11,82	48	16,72	0,085	NO
SOP	53	16,93	24	8,36	0,001	SI
Tubárica	35	11,18	28	9,76	0,569	NO
Cervical	6	1,92	3	1,05	0,38	NO
Uterina	9	2,85	13	4,53	0,281	NO
Abor de rep	5	1,6	1	0,35	0,124	NO
Otras	5	1,6	12	4,18	0,056	NO
TOTAL	313	99,97	287	100		

Tabla 49: Comparación entre las distintas indicaciones femeninas en ambos grupos

IV.2.5.- Indicaciones Masculinas

Haciendo la comparación entre los porcentajes de las distintas calidades del semen (normal, factor leve, severo y muy severo) en varones en los dos grupos, utilizando un test de “Chi cuadrado”, no se observa para ninguna categoría diferencias estadísticamente significativas, tal y como muestra la siguiente tabla 50:

	Embarazo	Embarazo	Fallo	Fallo		
Semen	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)	p valor	SIGNIFIC.
Normal	13	3,25	11	5,34	0,211	NO
Leve	160	40	72	34,95	0,226	NO
Severo	190	47,5	94	45,63	0,662	NO
Muy severo	37	9,25	29	14,08	0,07	NO
TOTAL	400	100	206	100		

Tabla 50: Comparación entre las calidades seminales de los grupos de embarazadas y con fallo

En cuanto a la procedencia del semen, en fresco o criopreservado, tampoco se observan diferencias estadísticamente significativas, como se indica en la tabla 51:

	Embarazo	Embarazo	Fallo	Fallo		
Procedencia	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)	p valor	SIGNIFIC.
En Fresco	371	92,75	182	88,35	0,069	NO
Congelado	29	7,25	24	11,65	0,069	NO
TOTAL	400	100	206	100		

Tabla 51: Comparación entre las procedencias seminales de ambos grupos

Y en cuanto a la forma de capacitación, por gradientes, en “gotitas” o “lavado”, sí se observan diferencias estadísticamente significativas en la forma de capacitar por gradientes y en la de “lavado” entre ambos grupos (Tabla 52).

	Embarazo	Embarazo	Fallo	Fallo		
Capacitación	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)	p valor	SIGNIFIC.
Gradientes	361	90,25	173	83,98	<0,05	SI
Gotitas	34	8,5	25	12,14	0,152	NO
Lavado	5	1,25	8	3,88	0,034	SI
TOTAL	400	100	206	100		

Tabla 52: Comparación entre la forma de capacitación de los grupos de embarazadas y con fallo

IV.2.6.- Técnicas de Reproducción Asistida (T.R.A.)

Las diferencias entre las distintas T.R.A. en los dos grupos se refleja en la tabla 53, en donde se puede observar una diferencia estadísticamente significativa en la técnica “mixta” (favorable al grupo con embarazo) y FIV convencional (favorable al grupo con fallo de fecundación) lo que significa que la técnica de la FIV convencional es significativamente más utilizada en los ciclos en los que hay un fallo de fecundación y la técnica mixta en los ciclos donde ha habido embarazo. Por tanto, la elección de una técnica adecuada el día de la punción puede hacer variar el resultado del ciclo.

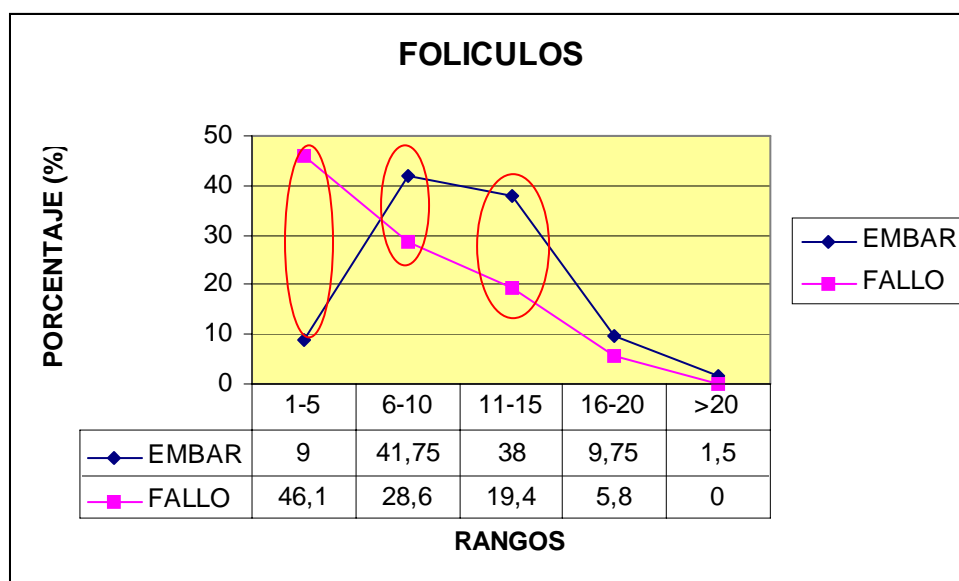
	Embarazo	Embarazo	Fallo	Fallo		
T.R.A.	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)	p valor	SIGNIFIC.
ICSI	304	76	150	72,82	0,391	NO
MIXTA	53	13,25	5	2,43	<0,05	SI
FIV	28	7	41	19,9	<0,05	SI
TESE	15	3,75	10	4,85	0,517	NO
TOTAL	400	100	206	100		

Tabla 53: Comparación entre las T.R.A. en los grupos con embarazo y con fallo

IV.2.7.- Folículos

La comparación de los folículos maduros (1,3 cm ó > 1,3 cm) por rangos entre los dos grupos, mujeres embarazadas y parejas con fallo de fecundación, podría dividirse en: De 1 a 5 folículos, de 6 a 10, de 11 a 15, de 16 a 20 y más de 20 folículos, tal y como muestra la gráfica 46. Se trata de una estratificación de rango por quintiles.

Se puede observar en la gráfica 45 que el porcentaje de mujeres en el grupo de embarazadas con un número de folículos entre 1 y 5 es claramente superior (46,1% vs 9%) al del grupo con fallo de fecundación. Dicho porcentaje va disminuyendo progresivamente de tal manera que no hay ninguna paciente del grupo con fallo con más de 20 folículos. En el caso del grupo gestante, el mayor porcentaje se sitúa en el rango de 6 a 10 folículos, seguido de cerca por el rango de 11 a 15; es decir, que nada menos que un 79,75% de las pacientes embarazadas han obtenido un número de folículos situado entre 6 y 15.



Gráfica 45: Foliculos en los dos grupos, estratificados por quintiles. EMBAR: grupo de embarazadas; FALLO: grupo con fallo de fecundación

En cuanto al estudio de la diferencia de medias entre dos variables independientes, aplicamos el test “t” de Student y la Prueba de Levene para la igualdad de varianzas, ya comentados, y que se resume en la siguiente tabla 54:

Estadísticos de grupo

	Grupo	Ciclos	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
FOLICULOS	Embar	400	10,7300	4,06860	,20343
	Fallo	206	7,3689	4,47211	,31159

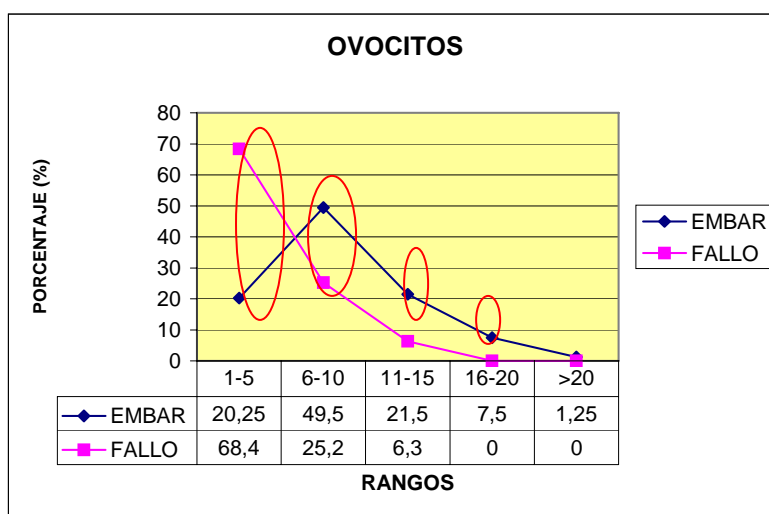
	Estadístico de contraste (F)	Nivel crítico (Sig.)	Estadístico de contraste (t)	Grados de libertad (gl)	Nivel crítico (Sig. Bilateral)	SIGNIFIC.
Foliculos	7,106	0,008	9,032	381,407	<0,05	SI

Tabla 54: Estadísticos y resultados del contraste sobre comparación de las medias de la variable “Foliculos” en los grupos de embarazadas y con fallo de fecundación

Al igual que ocurre en el caso de la edad y la FSH, el estudio de la comparación de medias de los folículos determina diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, pues el nivel crítico (sig. Bilateral) es menor de 0,05 (“p-valor” <0,05).

IV.2.8.- Ovocitos

La estratificación por rango de quintiles de los ovocitos obtenidos tras la punción folicular en ambos grupos, podría ser la misma que para el caso de los folículos, es decir, de 1 a 5 ovocitos, de 6 a 10, de 11 a 15, de 16 a 20 y más de 20 ovocitos/ciclo (gráfica 46).



Gráfica 46: Ovocitos en los dos grupos, estratificados por rangos de quintiles. EMBAR: grupo de embarazadas; FALLO: grupo con fallo de fecundación

Como se puede observar en la gráfica nada menos que en el 68,4% de los ciclos en los que ha habido un fallo de fecundación había de 1 a 5 ovocitos, mientras que este porcentaje se sitúa sólo en el 20,25% en el grupo de las embarazadas. En ningún ciclo del grupo con fallo ha habido más de 16 ovocitos, mientras que en el grupo gestante hay hasta un 8,75% de ciclos en los que se iguala o supera dicho número. En casi la mitad de los ciclos del grupo de embarazadas (49,5%) se han obtenido entre 6 y 10 ovocitos, siendo sólo la cuarta parte (25,2%) en los ciclos del grupo con fallo de fecundación.

Comparando las medias como hemos hecho hasta ahora, los cálculos serían los que vienen reflejados en la siguiente tabla 55.

Estadísticos de grupo

	Grupo	Ciclos	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
OVOCITOS	Embar	400	9,1875	4,29225	,21461
	Fallo	206	4,7136	3,15154	,21958

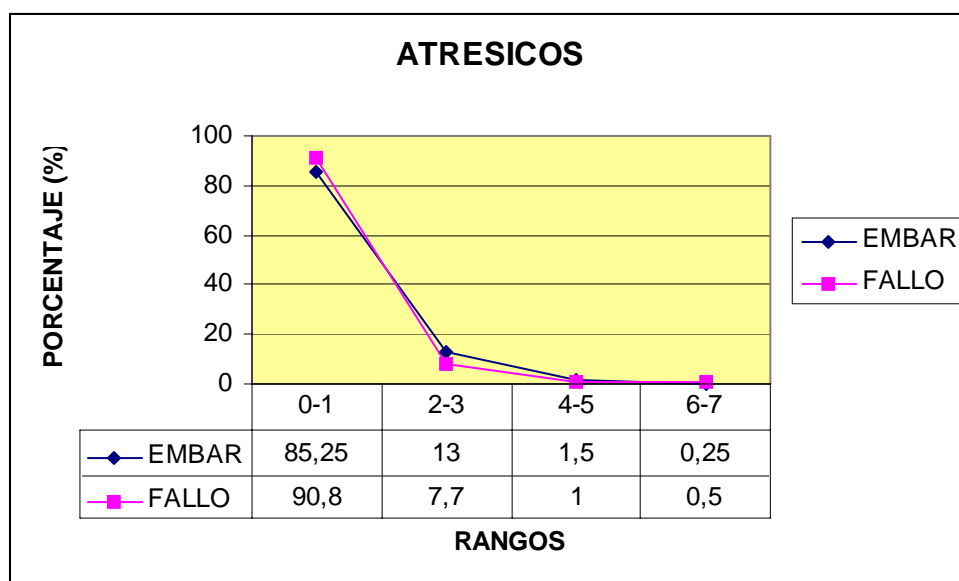
	Estadístico de contraste (F)	Nivel crítico (Sig.)	Estadístico de contraste (t)	Grados de libertad (gl)	Nivel crítico (Sig. Bilateral)	SIGNIFIC.
Ovocitos	15,308	0	14,571	533,571	<0,05	SI

Tabla 55: Estadísticos y resultados del contraste sobre comparación de las medias de la variable “Ovocitos” en los grupos de embarazadas y con fallo de fecundación

De nuevo se observan diferencias estadísticamente significativas si comparamos las medias entre ambos grupos referente a la variable “ovocitos” (“p-valor” < 0,05).

IV.2.9.- Ovocitos Atrésicos

Los ovocitos atrésicos son descartados tras finalizar la punción folicular. Nuevamente se ha realizado una estratificación por rango de percentiles. Los rangos en los que se dividen son: de 0 a 1, de 2 a 3, de 4 a 5 y de 6 a 7 ovocitos atrésicos por ciclo, siendo muy similares los porcentajes en ambos grupos, tal y como se describe en la gráfica 47. En la gran mayoría de los ciclos, de ambos grupos, los ovocitos atrésicos se sitúan entre 0 y 1 del total de ovocitos obtenidos tras la punción, siendo un porcentaje insignificante los ciclos con un número superior a 4 atrésicos (1,75% y 1,5% respectivamente).



Gráfica 47: Ovocitos atrésicos, estratificados por rango de cuartiles en ambos grupos. EMBAR: grupo de embarazadas; FALLO: grupo con fallo de fecundación

El estudio de la comparación de medias de los ovocitos atrésicos totales demuestra que no hay diferencias estadísticamente significativas (nivel crítico Sig. bilateral superior a 0,05, es decir, “p-valor” > 0,05) entre ambos grupos, e incluso, la media de dichos ovocitos es un poco mayor en el grupo gestante (0,59 vs 0,52) (tabla 56).

Estadísticos de grupo

	Grupo	Ciclos	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
ATRESICOS	Embar	400	,5950	,97383	,04869
	Fallo	206	,5243	,95094	,06626

	Estadístico de contraste (F)	Nivel crítico (Sig.)	Estadístico de contraste (t)	Grados de libertad (gl)	Nivel crítico (Sig. Bilateral)	SIGNIFIC.
Atrésicos	1,776	0,183	0,854	604	0,394	NO

Tabla 56: Estadísticos y resultados del contraste sobre comparación de las medias de la variable “Ovocitos Atrésicos” en los grupos de embarazadas y con fallo de fecundación

Además si sólo tenemos en cuenta los ovocitos atrésicos según la técnica, en este caso la ICSI, sigue sin haber diferencias estadísticamente significativas entre las medias (tabla 57).

Estadísticos de grupo

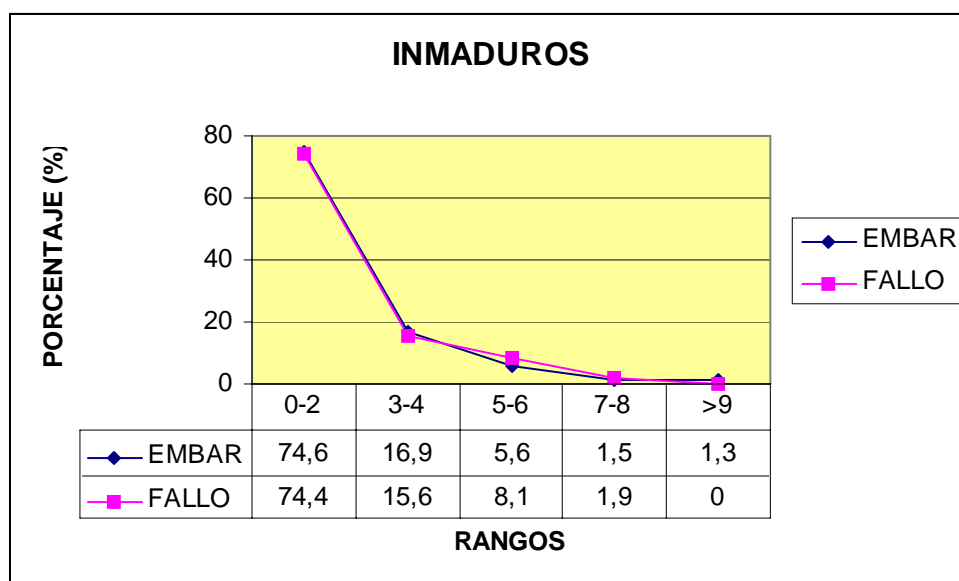
	Grupo	Ciclos	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
ATRES. ICSI	Embar	319	,5298	,90677	,05077
	Fallo	160	,5063	,86872	,6868

	Estadístico de contraste (F)	Nivel crítico (Sig.)	Estadístico de contraste (t)	Grados de libertad (gl)	Nivel crítico (Sig. Bilateral)	SIGNIFIC.
Atr. ICSI	0,78	0,378	-0,272	477	0,786	NO

Tabla 57: Estadísticos y resultados del contraste sobre comparación de las medias de la variable
“Ovocitos Atrésicos en ICSI” en ambos grupos

IV.2.10.- Ovocitos Inmaduros

Los ovocitos inmaduros, ya sean en metafase-I ó en profase-I, son contabilizados tras la decumulación y sólo en las técnicas de microinyección pura, pues no se cuentan los casos en los que se realiza la técnica mixta, como ya se planteó en su momento. Se realiza una estratificación por rango de quintiles. Los rangos de los ovocitos inmaduros se dividen en: de 0 a 2, de 3 a 4, de 5 a 6, de 7 a 8 y más de 9 ovocitos inmaduros. Los resultados para ambos grupos son muy similares, situándose el mayor porcentaje en el rango de 0 a 2 ovocitos inmaduros/ciclo (gráfica 48).



Gráfica 48: Ovocitos inmaduros de ICSI, divididos por quintiles, en los dos grupos. EMBAR: grupo de embarazadas; FALLO: grupo con fallo de fecundación

En cuanto a la comparación de las medias entre ambos grupos, no se observan diferencias estadísticamente significativas (nivel crítico Sig. bilateral superior a 0,05, es decir, “p-valor” > 0,05) e incluso, la media de ovocitos inmaduros es ligeramente superior en el grupo de embarazadas (1,77 vs 1,75) (tabla 58).

Estadísticos de grupo

	Grupo	Ciclos	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	
INMADUROS	Embar	319	1,7680	1,88909	,10577	
	Fallo	160	1,7500	1,79096	,14159	
	Estadístico de contraste (F)	Nivel crítico (Sig.)	Estadístico de contraste (t)	Grados de libertad (gl)	Nivel crítico (Sig. Bilateral)	SIGNIFIC.
Inmaduros	0,002	0,963	0,1	477	0,92	NO

Tabla 58: Estadísticos y resultados del contraste sobre comparación de las medias de la variable “Ovocitos Inmaduros” en ambos grupos (sólo en ICSI)

IV.2.11.- Ovocitos Madurados

Se trata de los ovocitos que en principio estaban en metafase-I y han madurado “in vitro”, pudiendo inyectarse. Sólo se analizan las medias, y el resultado es que no hay

diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (“p-valor” > 0,05) (tabla 59).

Estadísticos de grupo

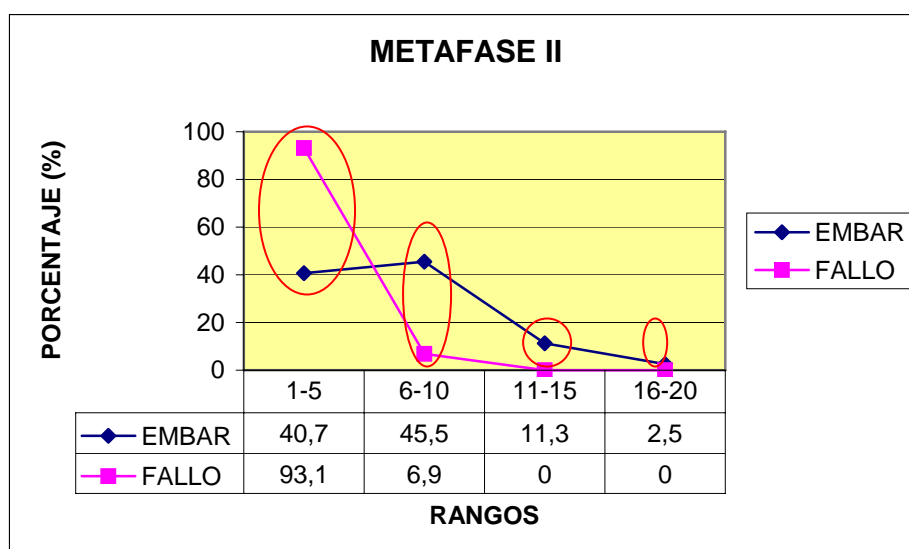
	grupo	Ciclos	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
MADURADOS	Embar	319	,2382	,59318	,03321
	Fallo	160	,3250	,74013	,05851

	Estadístico de contraste (F)	Nivel crítico (Sig.)	Estadístico de contraste (t)	Grados de libertad (gl)	Nivel crítico (Sig. Bilateral)	SIGNIFIC.
Madurados	6,392	0,012	-1,289	264,24	0,198	NO

Tabla 59: Estadísticos y resultados del contraste sobre comparación de las medias de la variable “Ovocitos Madurados” en ambos grupos (sólo en ICSI)

IV.2.12.- Ovocitos Maduros (Metafase-II)

Son los ovocitos que se inyectarán tras decumularse. Al igual que ocurre con los ovocitos inmaduros y madurados, sólo se estudian las técnicas de microinyección. La estratificación por rango de nuevo es por cuartiles. Los rangos se dividen en: de 1 a 5 ovocitos, de 6 a 10, de 11 a 15 y de 16 a 20 ovocitos maduros/ciclo. Tal y como se presenta en la gráfica 49, hay grandes diferencias entre los dos grupos, pues en el de las mujeres embarazadas el mayor porcentaje se sitúa en el rango de 6 a 10 ovocitos maduros (45,5%), mientras que en los fallos de fecundación en el 93,1% de los ciclos de ICSI hay desde 1 hasta 5 ovocitos maduros como máximo, y en ningún caso hay más de 11 ovocitos maduros, frente al 13,8% que suponen los ciclos del grupo gestante.



Gráfica 49: Ovocitos maduros (Metafase-II) de ICSI, divididos por rangos cuartílicos, en los dos grupos

Comparando, de nuevo, las medias de ambos grupos, se observan diferencias estadísticamente significativas, pues el nivel crítico Sig.Bilateral, o “p-valor” es $<0,05$ (tabla 60).

Estadísticos de grupo

	Grupo	Ciclos	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
M-II	Embar	319	6,8150	3,63426	,20348
	Fallo	160	2,4938	1,79796	,14214

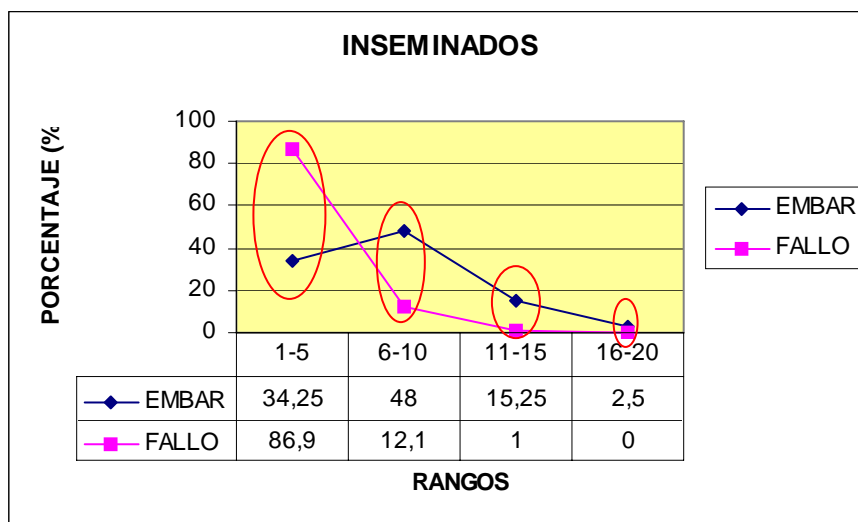
	Estadístico de contraste (F)	Nivel crítico (Sig.)	Estadístico de contraste (t)	Grados de libertad (gl)	Nivel crítico (Sig. Bilateral)	SIGNIFIC.
M-II	56,687	0	17,41	476,938	<0,05	SI

Tabla 60: Estadísticos y resultados del contraste sobre comparación de las medias de la variable “Ovocitos Maduros (M-II)” en ambos grupos (sólo en ICSI)

IV.2.13.- Ovocitos Inseminados

Los ovocitos “inseminados” son todos los ovocitos que se han tratado de fecundar, es decir, que han sido puestos en contacto con espermatozoides, ya sea mediante una fecundación “in vitro” convencional (inseminados, en número aproximado de 30.000 esptz/ovocito) o una microinyección espermática (inyectados,

con un único espermatozoide). Se realiza una estratificación por rango de cuartiles, siendo dichos rangos, de nuevo: de 1 a 5 ovocitos inseminados, de 6 a 10, de 11 a 15 y de 16 a 20 ovocitos inseminados/ciclo (gráfica 50).



Gráfica 50: Ovocitos inseminados, estratificados por rango de cuartiles, en los dos grupos. EMBAR: grupo de embarazadas; FALLO: grupo con fallo de fecundación

Esta gráfica se parece bastante a otras anteriores, la de ovocitos y la de ovocitos maduros. En el grupo de embarazadas se sigue manteniendo el mayor porcentaje en el rango de 6 a 10 ovocitos inseminados/ciclo, mientras que en el grupo con fallo de fecundación, casi el 87% de los ciclos se sitúan en el rango de 1 a 5 ovocitos inseminados, disminuyendo drásticamente el porcentaje a un 1% de ciclos con más de 11 ovocitos para inseminar (hasta un 17,75% en el grupo gestante).

Nos volvemos otra vez a encontrar con diferencias estadísticamente significativas en la comparación de medias de ovocitos inseminados en ambos grupos, pues el nivel crítico (Sig. Bilateral) es de 0 (“p-valor” < 0,05) (tabla 61).

Estadísticos de grupo

	Grupo	Ciclos	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
INSEM	Embar	400	7,3725	3,67185	,18359
	Fallo	206	3,0825	2,30122	,16033

	Estadístico de contraste (F)	Nivel crítico (Sig.)	Estadístico de contraste (t)	Grados de libertad (gl)	Nivel crítico (Sig. Bilateral)	SIGNIFIC.
Insem.	46,862	0	17,6	581,437	<0,05	SI

Tabla 61: Estadísticos y resultados del contraste sobre comparación de las medias de la variable “Ovocitos Inseminados” en los grupos con embarazo y con fallo de fecundación

IV.2.14.- Calidad Ovocitaria

Estudiada sólo en los casos de microinyección espermática pura, se da una clasificación al ovocito como de “Bueno”, “Regular” o “Malo”, según la presencia de dismorfismos ovocitarios y la forma de ruptura del mismo tras la ICSI, de tal manera que los ovocitos de mejor calidad son los que no tienen dismorfismos y forman el típico “cono de microinyección”. Lo normal es que el gameto femenino presente alguna característica morfológica que lo defina como ovocito “regular”. La tabla 62 muestra la relación existente entre las calidades ovocitarias de los grupos de embarazadas y con fallo de fecundación y si hay diferencias significativas o no.

	Embarazo	Embarazo	Fallo	Fallo		
CALIDAD	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)	p valor	SIGNIFIC.
BUENOS	418	18,58	125	27,72	<0,05	SI
REGULARES	1.679	74,62	301	66,74	<0,05	SI
MALOS	153	6,8	25	5,54	0,326	NO
TOTAL	2250	100	451	100		

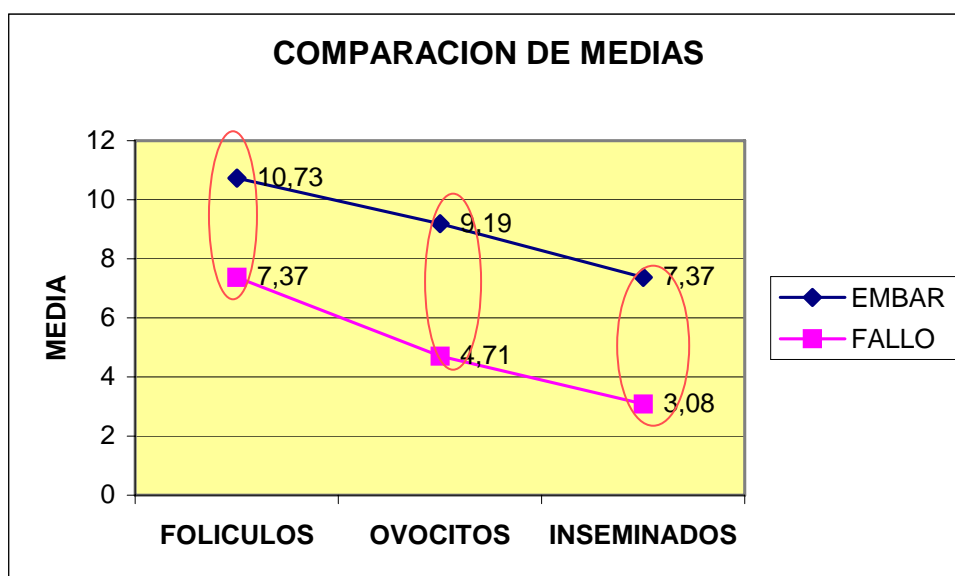
Tabla 62: Comparación de la calidad ovocitaria en ambos grupos

Existen diferencias estadísticamente significativas entre los ovocitos de buena calidad y los considerados como “regulares”, pero curiosamente el mayor porcentaje de ovocitos buenos corresponde al grupo con embarazo y no al grupo con fallo de fecundación, y viceversa para el caso de los regulares o normales. En cambio, no hay diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos para los ovocitos de mala calidad. Estos datos podrían revelar que la calidad ovocitaria no podría ser tomada en cuenta como variable determinante para asegurar que en un ciclo se produzca un fallo de fecundación, o bien, que al haber intervenido diferentes biólogos en estos ciclos, algunos han aplicado un protocolo más estricto que otros a la hora de contabilizar un ovocito como de calidad regular o de buena calidad; dicho en otras palabras, lo que un

biólogo podría considerar como de calidad excelente, para otro sería sólo como “regular”.

IV.2.15.- Medias de Folículos, Ovocitos y Ovocitos Inseminados

La gráfica 51 muestra la diferencia existente entre las medias de ambos grupos en cuanto a número de folículos maduros, número de ovocitos obtenidos tras la punción folicular y el número de ovocitos inseminados (una vez descartados los atrésicos en FIV convencional e ICSI, e inmaduros en el caso de la microinyección), el resultado sería el siguiente:



Gráfica 51: Comparación de medias de folículos, ovocitos e inseminados en los dos grupos. EMBAR: grupo de embarazadas; FALLO: grupo con fallo de fecundación

Todas las diferencias entre las medias del grupo con embarazo y del grupo con fallo de fecundación son estadísticamente significativas y además, casualmente, la media de folículos maduros del grupo con fallo coincide con la media de ovocitos inseminados del grupo gestante (7,37). Siempre habrá un número de ovocitos menor al esperado por el número de folículos maduros, pero mientras que en el grupo de las embarazadas baja de 10,73 folículos/ciclo a 9,19 ovocitos/ciclo (85,65%), en el grupo de los fallos de fecundación, dicha descompensación es mayor, pues se pasa de una

media de 7,37 folículos maduros/ciclo a tan sólo 4,71 ovocitos/ciclo, lo que supone que de cada 100 folículos maduros casi se obtienen 64 ovocitos (63,91%).

En cuanto a los ovocitos inseminados, al ser los porcentajes entre atrésicos e inmaduros casi similar en los dos grupos, las diferencias no son tan elevadas, pasando de 9,19 ovocitos/ciclo a 7,37 inseminados/ciclo en el primer grupo (80,2%), y de 4,71 ovocitos/ciclo a 3,08 inseminados/ciclo en el segundo grupo (65,39%). Es decir, que en el grupo con fallo de fecundación partiendo de una media de folículos maduros aceptable (7,37) tan sólo se van a inseminar una media de 3,08 ovocitos, es decir, solamente el 41,79%, un porcentaje muy inferior al de 68,69% existente entre folículos maduros y ovocitos inseminados en el grupo con embarazo.

IV.3.- ANÁLISIS DE REGRESIÓN LOGÍSTICA

Hemos intentado hallar una fórmula predictiva de las posibilidades de embarazo de una pareja en un ciclo teniendo en cuenta una serie de variables predictivas estudiadas, como son la edad, la FSH, el número de folículos maduros y el número de ovocitos obtenidos e inseminados. Se ha utilizado un modelo de regresión logística binaria, en donde se ha introducido como variable dependiente la tasa de embarazo, con dos valores, “0” (con una probabilidad “0” de embarazo, es decir, los casos de no fecundación, un total de 206), y “1” (con una probabilidad “1” de embarazo: las embarazadas, en total 400 ciclos); en cuanto a covariables se han utilizado las cinco comentadas anteriormente, según se muestra en la tabla 63.

Variables en la ecuación

		B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)
Paso 1(a)	EDAD	-,037	,028	1,727	1	,189	,964
	FSH	-,032	,032	,958	1	,328	,969
	FOL	-,038	,035	1,168	1	,280	,962
	OVO	-,003	,063	,002	1	,964	,997
	INSEM	,564	,077	52,964	1	,000	1,757
	Constante	-,152	1,079	,020	1	,888	,859

a Variable(s) introducida(s) en el paso 1: EDAD, FSH, FOL, OVO, INSEM.

Tabla 63: Resultados de la regresión logística binaria. FOL: es el número de folículos maduros; OVO: número de ovocitos obtenidos; INSEM: número de ovocitos inseminados.

La fórmula predictiva de las posibilidades de embarazo en un ciclo, en base a las variables anteriormente descritas, sería la siguiente:

$$P: 1 / 1 + e^{-z}$$

En donde “z” es el resultado de la ecuación: **B₁ x Edad + B₂ x FSH + B₃ x Fol + B₄ x Ovo + B₅ x INSEM + Constante**. En nuestro caso “z” se calcularía añadiendo valores a las variables y multiplicando por estos números: -0,037 para la edad, -0,032 para la FSH, -0,038 para los folículos, -0,003 para los ovocitos y 0,564 para los ovocitos inseminados, siendo -0,152 el valor de la constante.

Es decir:

$$P: 1 / 1 + e^{-(-0,037 \times \text{Edad} - 0,032 \times \text{FSH} - 0,038 \times \text{Fol} - 0,003 \times \text{Ovo} + 0,564 \times \text{Insem} - 0,152)}$$

Vamos a poner dos ejemplos de dos ciclos totalmente diferentes en cuanto a pronóstico, pues uno podríamos considerarlo como bueno y el otro como malo en función de dichas variables. El resultado de la probabilidad para ambos ciclos pone de manifiesto la importancia que tienen las variables estudiadas para pronosticar un posible embarazo. Por supuesto no se tienen en cuenta otras variables fundamentales en la consecución de la gestación, como la calidad embrionaria conseguida, el grosor del endometrio o la dificultad de la transferencia.

Ejemplo 1: Caso de buen pronóstico (tabla 64)

Var	Valores	B	Var x B
EDAD	30	-0,037	-1,11
FSH	5	-0,032	-0,16
FOL	15	-0,038	-0,57
OVO	12	-0,003	-0,036
INSEM	8	0,564	4,512
Cte		-0,152	-0,152
Valor z			2,484

Tabla 64: Valores aplicados en un ciclo de buen pronóstico

Si aplicamos la fórmula: **P: $1 / 1 + e^{-z}$** , el resultado sería el siguiente:

P: $1 / 1 + e^{-2,484}$; P: $1 / 1 + 0,083$; P: $1 / 1,083$, es decir: **P: 0,923**

La probabilidad de embarazo en un ciclo con estas características, consideradas como de buen pronóstico, con mujeres jóvenes de baja FSH (medida en mUI/ml) y un buen número, tanto de folículos maduros como de ovocitos obtenidos e inseminados, es cercana a 1 (0,923).

Ejemplo 2: Caso de mal pronóstico (tabla 65)

Var	Valores	B	VarxB
EDAD	40	-0,037	-1,48
FSH	10	-0,032	-0,32
FOL	5	-0,038	-0,19
OVO	3	-0,003	-0,009
INSEM	2	0,564	1,128
Cte		-0,152	-0,152
Valor z			-1,023

Tabla 65: Valores aplicados en un ciclo de mal pronóstico

Si aplicamos la fórmula: **P: $1 / 1 + e^{-z}$** , este es el resultado:

P: $1 / 1 + e^{1,023}$; P: $1 / 1 + 2,781$; P: $1 / 3,781$, es decir: **P: 0,264**

La probabilidad de embarazo en un ciclo con mujeres añosas, de alta FSH y bajo número de folículos punccionables y ovocitos obtenidos e inseminados es netamente inferior: 0,264, comparándolo con el anterior resultado: 0,923. Por tanto, en casos de mal pronóstico las posibilidades de gestación se reducen casi a la cuarta parte.

Si comparamos las diferentes variables cambiando solo alguna de ellas podemos llegar a una serie de conclusiones (tabla 66), como que es más importante el número de ovocitos inseminados que la edad o la FSH.

Nº ejemplo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
EDAD	30	40	30	43	43	32	35	30	40	30	30
FSH	5	10	10	5	5	10	7	10	10	5	5
FOL	15	5	5	15	12	6	10	15	15	20	15
OVO	12	3	3	12	10	4	8	12	12	12	12
INSEM	8	2	2	8	7	3	5	8	8	8	10
z	2,484	-1,02	-0,653	2,003	1,559	-0,564	0,745	2,34	1,954	2,294	3,612
e^{-z}	0,083	2,781	1,921	0,135	0,210	1,758	0,475	0,096	0,142	0,1	0,027
P	0,923	0,264	0,342	0,881	0,826	0,363	0,678	0,912	0,875	0,909	0,973

Tabla 66: Diferentes ejemplos

Los ejemplos 1 y 2 son los correspondientes a los casos ya descritos de pronósticos bueno y malo. Si comparamos el 1 con el 4, en el que la mujer es muy mayor (43 años), vemos que la probabilidad de embarazo sigue siendo alta, sin embargo si comparamos con el 3, vemos que las posibilidades disminuyen enormemente, a pesar de ser una paciente joven, pues sólo tiene 2 ovocitos inseminados. Lo mismo ocurre con el ejemplo nº 6, paciente joven con baja respuesta. El nº 8 tiene una buena posibilidad de embarazo, pero no es un buen ejemplo pues sólo se ha variado la FSH (duplicándola con respecto al nº 1), sin embargo tiene una buena respuesta, lo que generalmente no es acorde con las FSH altas. El ejemplo nº 7 podría considerarse como un ciclo medio.

Los ejemplos nº 5 y nº 9 confirman la teoría de que, según esta fórmula predictiva, es más importante para la consecución del embarazo el número de ovocitos inseminados, pues las probabilidades son altas a pesar de haber un factor etario (nº 5) y además FSH alta (nº 9), pero hay una buena respuesta ovocitaria (12 ovocitos obtenidos y 8 inseminados en ambos casos). La diferencia entre el número de folículos maduros y el de ovocitos obtenidos también es importante; al comparar los ej 1 y 10, observamos que en el segundo caso hay más folículos pero los mismos ovocitos siendo la probabilidad de embarazo menor (0,923 vs 0,909). Hay que tener en cuenta que no sólo tiene su importancia el número de ovocitos si no sobre todo el número con los que se va a trabajar, es decir, cuantos menos atrésicos e inmaduros haya, mejores resultados habrá, como confirma el ej nº 11 comparado con el 1 (0,973 vs 0,923).

En la última tabla (ejemplos 12 y 13 – Tabla 67) se han simulado datos llevados al extremo, pues son mínimos los ciclos que pudieran cumplir todos los requisitos establecidos en torno a las cinco variables estudiadas. El primero (nº 12) porque con un

número elevado de folículos y ovocitos obtenidos seguramente la transferencia en fresco se debería cancelar, por riesgo de hiperestimulación ovárica, disminuyendo las posibilidades de embarazo al criopreservar todos los embriones resultantes; en el segundo caso (nº 13) se optaría a una donación de ovocitos, pero como ya se ha recalcado anteriormente, la pareja quiere agotar todas las posibilidades de ser padres biológicos antes de decidir cualquier tipo de donación de gametos.

Nº ejemplo	12	13
EDAD	25	43
FSH	3	15
FOL	20	4
OVO	18	3
INSEM	16	1
z	7,037	-1,82
e^{-z}	0,0009	6,17
P	0,9991	0,139

Tabla 67: Ejemplos llevados al extremo

V.- COMENTARIOS

V.1.- COMENTARIOS GENERALES

En este estudio, en el que se han comparado una serie de variables, entre un grupo con fallo de fecundación y otro en el que ha habido embarazo, en el mismo periodo de tiempo, se ha llegado a unas conclusiones muy claras y a otras que no lo son tanto. Se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre las medias de edades, FSH al comienzo del ciclo, número de folículos maduros, de ovocitos recuperados tras la punción folicular, de ovocitos maduros (en ICSI) y de ovocitos inseminados; no así en ovocitos atrésicos, ni en inmaduros ni madurados (ICSI). Es decir, un ciclo puede ir mal si se cumple alguna de estas circunstancias: mujeres mayores de 37 años, FSH elevada, número de folículos maduros, ovocitos obtenidos e inseminados inferior a 5, o un alto porcentaje de inmadurez o atresia en los ovocitos obtenidos. En un estudio realizado en 2005 sobre datos de 10 años en una clínica canadiense, ya comentan que el número de folículos y ovocitos maduros, así como la edad de la mujer son datos importantes en los ciclos con fallo de fecundación (55).

También hay diferencias en la T.R.A. utilizada (es mejor realizar una técnica mixta que una FIV convencional), el tipo de capacitación de la muestra (mejor gradientes), la indicación (peor pronóstico si es mixta) y, curiosamente, la indicación femenina “S.O.P.”, que es significativamente mayor en el grupo de las embarazadas.

En cuanto a la calidad del semen no se observan diferencias entre ambos grupos, así como si proceden de muestras criopreservadas o en fresco, y en cuanto a la calidad de los ovocitos también hay un dato curioso: son más los de “buena calidad” en el grupo con fallo de fecundación. Es decir, que en principio, una buena elección de la técnica para inseminar, siempre y cuando el semen lo permita, y una buena respuesta ovocitaria (entre 6 y 10 ovocitos maduros), podrían ahorrar un elevado número de ciclos con fallo de fecundación.

El problema se plantea cuando sólo hay 1 ovocito y hay que elegir la técnica: o FIV convencional o ICSI, por la que apuestan algunos autores (56), ya que la mixta es imposible. Si hay un factor masculino y el ovocito presenta aspecto de inmadurez, en un tanto por ciento elevado el ciclo puede ir mal, pues lo ideal es que el ovocito esté

maduro tras su decumulación. En la mayoría de los casos en los que sólo ha habido 1 ovocito que, tras horas en incubación, ha madurado “in vitro”, y después se ha inyectado, se ha observado que no presenta fecundación pasadas las horas pertinentes, pues podría ocurrir que el ovocito haya alcanzado la madurez nuclear, pero no la madurez citoplasmática, necesaria para completar la fecundación, incluso con el espermatozoide dentro.

Además hay que tener en cuenta las mejores condiciones posibles dentro del laboratorio de FIV: calidad del aire, con sistemas de climatización y filtración del mismo, asegurando menos cambios en la temperatura y humedad ambientales; esterilidad máxima; oscuridad y manejo rápido de gametos y embriones; control de medios y aparatos, como el inyector en la ICSI; equipamientos, como las campanas de flujo laminar provistas de superficies calefactadas, que facilitan el trabajo diario; medición de temperaturas y nivel de CO₂ en las cabinas; evitar posibles contaminaciones, etc. Todo ello redunda en un mejor control de las condiciones ambientales y en los procesos en general, pudiendo aumentar la calidad embrionaria y, por tanto, la tasa de gestación.

Los protocolos de trabajo del laboratorio han de ser siempre revisados y actualizados, así como la intervariabilidad entre los biólogos, pues todos han de pasar por un tiempo de aprendizaje y realizar los procedimientos con las máximas garantías posibles de seguridad y resultados.

En España se calcula que existen entre 600.000 y 800.000 parejas que necesitarían de los servicios de unidades de reproducción asistida (48). Nuestro país es el tercero de Europa en dichas técnicas por detrás de Francia y Alemania, contabilizándose, gracias a ellas hasta un 2,9% del total de recién nacidos según datos del año 2007 de la SEF (Sociedad Española de Fertilidad). Según este estudio se podría estimar hasta en 1.241 ciclos de FIV-ICSI realizados por cada millón de habitantes.

La esterilidad afecta a casi un 20% de las parejas con edad reproductiva, cifra que aumenta progresivamente con el paso de los años por los cambios producidos en nuestra sociedad. El factor masculino está involucrado en, al menos, la mitad de los casos: una buena calidad seminal, tanto en número como en morfología y motilidad,

unido al estado de los acrosomas, de las membranas, del número correcto de cromosomas o de la integridad del ADN espermático, son cruciales para llevar a cabo una fecundación con éxito. Sin embargo, el estudio de este último parámetro no es tan sencillo, lo que ha dificultado su incorporación rutinaria en la elaboración de los seminogramas; de hecho en este trabajo no se ha tenido en cuenta la fragmentación espermática, pues en el periodo estudiado no se realizaba de rutina en nuestro laboratorio.

A pesar de utilizar los parámetros seminales propuestos por la OMS, hasta un 15% de los varones estériles presentan un seminograma normal, por lo que se podría considerar que no sean del todo indicativos de la calidad de los espermatozoides presentes en una muestra seminal. Adicionalmente, al añadir otro tipo de parámetros como la integridad del acrosoma, la vitalidad, la evaluación de ciertas actividades enzimáticas o la integridad funcional de la membrana, la conclusión a la que se llega es que ningún parámetro “per se”, se puede considerar de valor diagnóstico absoluto de la infertilidad masculina.

La presencia de defectos en el material genético, tales como anomalías en la condensación de la cromatina, en relación con el proceso de la maduración del gameto masculino, la integridad de la molécula del ADN asociada con la presencia de roturas, tanto de doble cadena como de cadena sencilla, o la existencia de anomalías cromosómicas, como las aneuploidías o las reordenaciones genómicas estructurales, se asocian con la infertilidad.

En lo que se refiere al origen del daño en el ADN del espermatozoide, hay toda una serie de posibles factores. Se sabe que la generación de radicales libres de oxígeno (ROS), o bien fallos en el intercambio correcto de la fracción histónica de las cromatinas por las protaminas (alteración de la protaminación), o una deficiencia en la recombinación meiótica pueden producir daño irreversible en el ADN del gameto. Incluso la incidencia del fenómeno apoptótico en los espermatozoides de un eyaculado que se manipula para un proceso de reproducción asistida, podría generar una situación de “acción enzimática fuera de control”, pudiendo contribuir y acelerar el proceso de degradación celular, afectando de forma indirecta a otros espermatozoides.

El uso de algunos fármacos, la contaminación atmosférica, el tabaquismo, los episodios de fiebre alta, una temperatura testicular elevada, anomalías anatómicas como el varicocele, o una edad avanzada, incrementan las tasas de daño registrado en el ADN espermático, si bien es cierto que el ovocito tiene capacidad para reparar el ADN dañado. Así pues el efecto biológico de la fragmentación del ADN espermático sobre la fecundación depende del balance entre el daño de la cromatina espermática y la capacidad de reparación del ovocito.

La introducción de nuevas técnicas que hasta hace no mucho eran irrealizables, ahora son rutinarias en el laboratorio: FISH de espermatozoides, estudio de fragmentación en el gameto masculino (figura 5), Diagnóstico Genético Preimplantacional, y en gran medida ayudan al equipo bio-médico y a la pareja a tomar una decisión, que a veces, es muy difícil, como el cambio de gameto, pues en ocasiones la causa de un fallo de fecundación puede estar “oculto”, ya sea a nivel genético (FISH alterado de espermatozoides) o a nivel molecular (fallos en la reacción acrosómica).

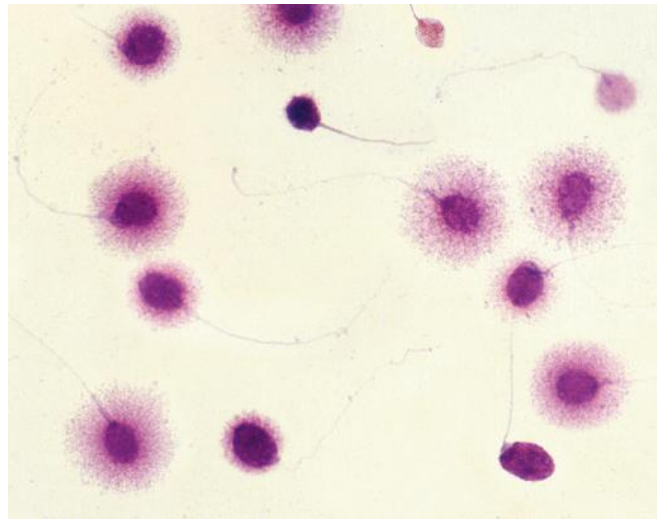


Figura 5 : Estudio de fragmentación en espermatozoides: Los que no tienen el ADN fragmentado desarrollan un halo de dispersión alrededor de la cabeza del espermatozoide (halos grande e intermedio); los espermatozoides con ADN fragmentado no desarrollan dicho halo (sin halo, pequeño o degradado).

Además se podría decir, en base a los resultados obtenidos cuando se ha hecho un seguimiento de ciclos posteriores en las parejas con fallo de fecundación, que cuando ocurre en un ciclo no tiene por qué pasar en el siguiente (57) y tras un estudio más exhaustivo de la pareja, se puede recomendar realizar otro ciclo (cambiando, por ejemplo, de técnica), pero conviene cambiar de gameto cuando el fallo total de fecundación persiste, aunque es necesario ayudar a los pacientes en esta difícil toma de decisión (58).

V.2.- FACTORES EN CICLOS CON FALLOS DE FECUNDACIÓN

Todavía no se conocen todos los factores que pueden originar un fallo de fecundación (59), por lo que su tratamiento en el laboratorio de FIV es complicado y de difícil solución. Hay una serie de parámetros, que se manejan generalmente en el laboratorio, con los que se intenta establecer las posibles causas del fallo y la manera en que podríamos intentar evitarlo en futuros ciclos. En una FIV convencional el fallo podría deberse a la imposibilidad de penetración por parte del espermatozoide, mientras que en una ICSI la principal causa podría residir en un fallo en la activación del ovocito (60, 61).

V.2.1.- Factores en FIV:

Aproximadamente el 15% de las FIV acaba en un fallo total de fecundación. En principio se instauró para los casos de patología tubárica bilateral, pero hay otras indicaciones, como la esterilidad masculina leve en número y motilidad (factor masculino leve), los fracasos previos de inseminación artificial (homóloga o conyugal y de donante), la endometriosis, el factor etario, trastornos inmunológicos, trastornos ovulatorios, la esterilidad multifactorial y la esterilidad idiopática o de origen desconocido. En general el número de casos en donde sólo se aplica la FIV en todos los ovocitos ha disminuido, a pesar de ser, a nivel de laboratorio, una técnica de reproducción asistida mucho más sencilla que la ICSI, pues no requiere, por ejemplo, de un material especial (microscopio invertido, microinyector, etc). Las posibles causas en un fallo de FIV pueden ser (59):

1.- Ausencia de espermatozoides en las gotas de inseminación: Ya sea por un error a la hora de preparar la placa de inseminación o por un error a la hora de realizar la inseminación, colocando los ovocitos en una placa de cultivo sin gametos masculinos.

2.- Espermatozoides procedentes de semen congelado: Siempre se recomienda la utilización de semen en fresco para inseminar los ovocitos, pero hay ocasiones en que es inevitable la utilización de semen criopreservado (donantes, pacientes que no se encuentran presentes el día del ciclo, quimioterapia o radioterapia posterior, etc). Aunque en este estudio no se han demostrado diferencias estadísticamente significativas entre ciclos con fallo de fecundación y embarazo cuando se trata de semen congelado (11,65% frente a un 7,25%), parece ser que el proceso de la congelación puede alterar la reacción acrosómica, disminuyendo así la capacidad fertilizadora de estos espermatozoides, e incluso, aumentar la fragmentación del ADN espermático.

Los gametos masculinos de mamíferos, incluyendo el hombre, una vez eyaculados, son incapaces de fecundar el ovocito sin antes experimentar un proceso de maduración final conocido como “capacitación espermática”, que dará lugar a una modificación en la movilidad flagelar y al “bateo” de la cabeza del espermatozoide, lo que favorece la penetración en el ovocito.

La capacitación espermática consiste en una cascada de reacciones bioquímicas que se inician con la salida del colesterol de la membrana, la fosforilación de los residuos de tirosina en proteínas flagelares, y la expresión de fosfatidilserina en la zona apical de la cabeza. El líquido seminal, además de factores decapacitantes como el colesterol, que inhiben la capacitación espontánea de los espermatozoides tras la eyaculación, también contiene otros factores que pueden interferir con la penetración del moco cervical, la reacción acrosómica “in vitro” y el proceso de fertilización. El contacto con el líquido seminal por un periodo superior a los 30 minutos post-eyaculación, puede disminuir de forma permanente la capacidad fertilizante de los espermatozoides “in vitro”; además, la contaminación de una mínima cantidad de líquido seminal en espermatozoides procesados puede inhibir su capacidad fecundante.

Así pues, los espermatozoides que se vayan a usar en FIV convencional, ICSI o técnica mixta, deberían de ser aislados del líquido seminal, no sólo lo antes posible

después de la eyaculación y licuación del semen, sino también lo más eficientemente posible. Si bien la eficacia de un método de preparación de espermatozoides se suele medir por la concentración de espermatozoides móviles recuperados (REM, Recuento de Espermatozoides Móviles), es de gran importancia también asegurarse de evitar o minimizar la presencia de microorganismos derivados del semen.

Es muy importante el realizar una buena criopreservación con este tipo de muestras tan valiosas: hay que tener en cuenta que este proceso afecta a la calidad espermática, y en especial a la motilidad. Por todo ello se hace necesario el uso de sustancias y medios que protejan al máximo a los espermatozoides del daño que puedan causar las bajas temperaturas; de ahí la existencia de los medios crioprotectores y de los recipientes adecuados para mantenerlos en óptimas condiciones (62).

Los medios crioprotectores están formados por componentes ácidos, básicos y nutrientes que aportan energía a las células espermáticas, debiendo ser, además, soluciones isosmóticas con el plasma seminal, con idéntica fuerza iónica, capacidad tampón y un pH próximo a la neutralidad. Los crioprotectores pueden ser de dos tipos:

- .- Penetrantes: Entran en las células y desplazan el agua que hay en ellas ocupando su sitio y, evitando de esta manera, la formación de cristales de hielo intracelular durante la congelación lenta. Ejemplos de este tipo son el metanol, el glicerol, el dimetilsulfóxido y el etilenglicol.

- .- No penetrantes: Actúan rodeando la membrana plasmática, induciendo así la formación de cristales alrededor de la misma y protegiendo a las células. Ejemplos de este tipo son los azúcares, las lipoproteínas de la yema de huevo y las proteínas de alto peso molecular.

Los medios crioprotectores más usados son los basados en el glicerol (como el utilizado en la clínica Ginefiv) y en la yema de huevo.

Los problemas que nos podemos encontrar a la hora de la congelación espermática son principalmente dos: número insuficiente de espermatozoides post-descongelación y contaminación de la muestra a las 24 horas. En ambos casos el paciente ha de ser avisado lo antes posible. Si no ha habido ningún problema se le remite al cabo de unos días para que recoja un informe de la congelación espermática,

en donde se incluye un seminograma previo y el número de espermatozoides post-descongelados, así como la técnica más efectiva por la utilización de la muestra, que por regla general va a ser la microinyección, ya sea por muestra valiosa (radioterapia) o por la bajada de calidad espermática por la propia congelación.

3.- Presencia de contaminación a las 16-20 horas post-inseminación: La existencia de bacterias o levaduras podría actuar directamente, afectando a la integridad de ambos gametos, o indirectamente, alterando las condiciones del medio de cultivo (pH, PO₂, secreción de sustancias tóxicas, etc). Para averiguar el origen de la contaminación y prevenir futuros fallos de fecundación por dicha causa hay que establecer los posibles focos, ya sea en las gotas de inseminación o en las gotas de lavado.

.- Si son las gotas de inseminación las que están contaminadas, se verifica si hay contaminación en la dilución utilizada, y si es así, se procede a identificar y constatar que se trata del mismo microorganismo, que puede darnos una idea del origen de la contaminación (recogida incorrecta de la muestra, infección genito-urinaria), permitiendo así adoptar las medidas oportunas para cada caso.

.- Si son las gotas de lavado las que presentan contaminación, se comprueba si se ha producido por manipulación, o durante la punción folicular o si es por causa seminal (menos probable) o debido a otras causas.

Medidas preventivas en el laboratorio pueden incluir el estudio de distintas placas de cultivo para ver si crece algún tipo de microorganismo situadas en lugares estratégicos.

4.- Ausencia de espermatozoides móviles a las 16-20 horas post-inseminación: Aunque no hay relación entre el porcentaje de gametos móviles a las 24 horas tras la inseminación y la tasa de fecundación, sí la hay cuando no hay espermatozoides móviles 24 horas después: la tasa de fecundación disminuye significativamente y aumentan los casos con fallo de fecundación.

5.- Ausencia de espermatozoides unidos a la zona pelúcida (ZP) a las 16-20 horas post-inseminación.: Posiblemente la mayoría de los fallos en FIV sean debidos al gameto masculino (31), quedando demostrado en la actualidad que hasta en la cuarta

parte de los pacientes con esterilidad de origen desconocido puede haber un defecto en la interacción espermatozoide-ZP, que de lugar a un fallo de fecundación (32, 33). En muchos casos se han observado pocos o ningún espermatozoide adherido a la ZP (en nuestro estudio hasta el 63,41%), pues ciertos defectos en la ZP podrían afectar a la reacción acrosómica (34), impidiendo la penetración del espermatozoide.

6.- Otras posibles causas, a nivel molecular y genético podrían ser: Alteraciones en el reconocimiento mutuo entre ambos gametos, fallos en la reacción acrosómica, problemas en la penetración del espermatozoide, alteraciones en la unión del mismo al oolema, alteraciones cromosómicas del espermatozoide (FISH alterado), fallos en la formación normal de los pronúcleos, defectos del centrosoma que puede originar fallos en la nucleación y formación de los microtúbulos, fallos en la descondensación de la cabeza del espermatozoide, alta fragmentación del ADN del mismo (63), etc.

7.- Condiciones subóptimas durante la estimulación: Caída del estradiol, suministro de la hCG en un día equivocado, realización del “coasting” (inhibición de gonadotropinas), luteinización prematura, valores de progesterona elevados o una mala administración de la medicación, podrían repercutir de forma negativa sobre la calidad ovocitaria, aunque es extraño que todos los ovocitos de un mismo ciclo puedan quedar tan dañados como para provocar un fallo de fecundación. Pero sí es cierto, y en este estudio queda demostrado, que una baja respuesta, tanto en número de folículos punccionables, como en ovocitos recuperados y en ovocitos maduros, puede ser una causa importante de dicho fallo, como ya han destacado otros autores (64). También podría ser la causa en ciclos con un número aceptable de ovocitos y con ausencia de factor masculino.

8.- Condiciones durante la punción: Presión inadecuada del sistema de aspiración por parte del ginecólogo, un tiempo excesivo en la búsqueda de los ovocitos por parte del biólogo, presencia excesiva de sangre (punción folicular “hemática”) y manipulación incorrecta de los ovocitos pueden ser suficiente causa para provocar una bajada en la calidad de los mismos y producir un fallo de fecundación.

9.- Apariencia de los ovocitos tras la punción: La apariencia del complejo cúmulo-corona-ovocito (CCCO) puede dar una idea del estado de madurez del ovocito

(maduro o M-II, inmaduro en M-I, e inmaduro en P-I), pero la estimulación puede actuar sobre dicha apariencia (65), no siendo muy clara tal clasificación.

10.- Estadio de los ovocitos a las 16-20 horas post-inseminación: Si hay ovocitos inmaduros, no se ha podido producir la fecundación; si son maduros y no están fecundados puede ser debido a la imposibilidad por parte del espermatozoide de penetración o por inmadurez citoplasmática, como es el caso de los M-I que han madurado “in vitro”; es decir, hay madurez nuclear pero no del citoplasma, que resulta indispensable para iniciar los procesos bioquímicos necesarios para la fecundación, aunque esté el espermatozoide en el interior del ovocito (60, 66).

11.- Presencia de dismorfismos ovocitarios graves: Como se ha comprobado en el estudio (aunque sólo en casos de ICSI, tras decumular), la calidad ovocitaria no es motivo claro para que se produzca un fallo de fecundación, pues es muy extraño que todos los ovocitos de un ciclo presenten graves dismorfismos. Un ovocito normal presenta una zona pelúcida proporcionada, definida y regular, con un espacio perivitelino prácticamente virtual, no observándose ninguna zona más amplia que aquella en la que está el corpúsculo polar. La forma ha de ser perfectamente esférica y el citoplasma homogéneo en densidad y sin ninguna estructura que llame la atención en su interior. El corpúsculo polar será ligeramente aplanado, bien definido, único y de contenido también homogéneo (67).

La calidad ovocitaria, por tanto, no se puede incluir como parámetro de relevancia en la categorización del embrión, aunque es cada vez más evidente que deberá ser tomada en cuenta en un futuro conforme vayan publicándose más datos. Lo que parece ser cierto es que las alteraciones citoplasmáticas severas, como la presencia de acumulaciones de retículo endoplásmico liso, la granulosis severa centralizada y la vacuolización excesiva podrían perjudicar el desarrollo embrionario y su potencial implantatorio (68). También es importante la densidad de la ZP: a mayor densidad, peor pronóstico.

V.2.2.- Factores en ICSI:

En principio utilizada para casos de factor masculino, actualmente su práctica se ha incrementado en todos los laboratorios del mundo, aumentando los ciclos que, por protocolo, pueden requerirla, como los fracasos previos de inseminación artificial, fallos o baja tasa de fecundación en FIV, sémenes valiosos (congelación previa quimio o radioterapia o previa vasectomía), semen procedentes de pacientes portadores de HCV, HBV y HIV, infertilidad de causa inmunitaria, imposibilidad de recoger la muestra (también previa biopsia testicular o aspiración de epidídimo), diagnóstico genético preimplantacional (DPI o DGP), mala calidad o la baja respuesta ovocitaria (69, 70), aunque no todos los autores están de acuerdo (67), como se verá más adelante.

A pesar de que el espermatozoide está dentro del ovocito, salvando así muchos problemas de la FIV, se siguen produciendo fallos de fecundación en ICSI, quizás debido a diversos factores inherentes a la misma técnica. Actualmente, esta técnica se realiza, ya sea pura o mixta, en casi todos los ciclos de fecundación “in vitro”. Los posibles factores implicados en un fallo total de fecundación en la ICSI podrían ser los siguientes (59):

1.- Factores comentados anteriormente: condiciones subóptimas durante la estimulación y la punción, presencia de dismorfismos ovocitarios graves, presencia de contaminación, defectos en la activación ovocitaria, fallos en la descondensación de la cabeza del espermatozoide, formación anormal de los pronúcleos, fragmentación del ADN del gameto masculino, FISH alterado, etc.

2.- Condiciones subóptimas durante la decumulación o “pelado” de los ovocitos: Ya sea por una concentración elevada de la enzima hialuronidasa, por un tiempo excesivo durante la decumulación o por la utilización de pipetas de decumulado con un diámetro inadecuado, aunque es extraño que todos los ovocitos puedan quedar dañados durante dicho proceso.

3.- Problemas durante la microinyección: Algunas de las posibles causas de fallo de fecundación se podrían considerar como inherentes a la técnica: la utilización de PVP (PoliVinil Pirrolidona) para detener a los espermatozoides, el “forzar” la

fecundación, la no activación del ovocito, etc. También hay una serie de problemas que se pueden presentar durante el proceso como la propia inexperiencia del biólogo, el uso de pipetas defectuosas, una óptica del microscopio no calibrada, un sistema hidráulico o de micromanipulación en malas condiciones, el número de intentos para realizar la ICSI, el tipo de ruptura del ovocito (no formación del “cono de microinyección”) o la propia localización del espermatozoide en el interior del ovocito; todas o algunas de estas situaciones pueden ser causas más que suficientes para que haya una bajada en las tasas de fecundación e, incluso, un fallo total de la misma si añadimos una pobre respuesta ovocitaria.

4.- Espermatozoides procedentes de biopsias testiculares (TESE+ICSI): Aunque las tasas de fecundación, desarrollo embrionario y gestación de estos casos son comparables a las muestras de eyaculado en fresco (72), parece ser que existe un efecto negativo sobre la implantación de los embriones generados a partir de estos gametos (73). A veces ocurre que la calidad de dichos espermatozoides es tan baja que hay que inyectar formas no del todo normales; se trata de biopsias con escaso número de gametos y de morfología muy alterada, sobre todo de cabeza, lo que está más implicado con problemas de fecundación. Sin embargo, los casos de TESE+ICSI estudiados no revelan diferencias estadísticamente significativas, aunque el porcentaje es algo mayor en el grupo con fallo de fecundación (4,85% vs 3,75%).

La biopsia testicular abierta, o TESE, es la técnica estándar usada para recuperar espermatozoides de testículo. Consiste en la obtención de una muestra de parénquima testicular, que será procesada después en el laboratorio para confirmar la presencia de espermatozoides. Generalmente se trata de un proceso quirúrgico menor que se realiza bajo anestesia local (bloqueo anestésico del cordón espermático), no precisando ingreso. No requiere de abstinencia sexual previa y el paciente ha de rasurarse el escroto, ducharse, tomar una comida ligera unas dos o tres horas antes de la cirugía, tomar la primera dosis de antibiótico como media hora antes de la comida y realizar el tratamiento pautado por su médico.

Antes de comenzar la intervención, el urólogo ha de contar con una caja de instrumental perfectamente estéril y el biólogo con el medio de cultivo y todo el material estéril necesario: Pipetas Pasteur envasadas individualmente, portaobjetos en

paquetes de dos, jeringas de insulina, placas nunc de 4 pocillos, placas de Petri, cubreobjetos y portaobjetos. Se requiere un microscopio invertido (Nikon, TMS-F), cuyo objetivo utilizado será el de 40x. Previamente el biólogo ha preparado 5 ml de medio Gamete™ (Vitrolife) más 0,1 ml de heparina en un tubo cónico, dejándolo en la estufa a 37°C y 5% CO₂, para que se vaya atemperando. La cabina de flujo encendida, limpia y con todo el material necesario. El procedimiento será el siguiente (72):

- Se limpia y desinfecta la piel escrotal. Generalmente es un urólogo el que realiza la biopsia testicular.

- Se realiza una incisión transversal de, aproximadamente 1 cm en el escroto, sobre el polo superior del testículo (figura 6a).

- Se diseccionan una a una las capas del testículo hasta llegar a la túnica albugínea.

- Se practica un corte, con bisturí, de unos 0,5 cm a lo largo de la albugínea, en la superficie anterior del polo superior del testículo.

- Tras realizar una pequeña presión sobre el testículo, se extirpa una pequeña pieza (del tamaño aproximado de una lenteja) del parénquima testicular que sobresale (figura 6b).



Figura 6: Incisión en el escroto (a), extracción del tejido (b) y tejido en placa de Petri para ser diseccionado (c).

- El tejido se coloca inmediatamente en uno de los pocillos de la placa con medio de cultivo de 0,5 a 0,8 ml, y a 37°C. La placa se lleva al laboratorio, y con ayuda de una jeringa de insulina sin aguja, la muestra se deposita en una Placa de Petri P-60 (figura 6c), junto con medio de cultivo nuevo (0,3-0,4 ml de Gamete), en donde se procede a la disección del tejido con ayuda de dos hojas de bisturí, agujas unidas a

jeringas de insulina, o portaobjetos estériles. Así se desgarran los túbulos seminíferos, permitiendo la liberación de los espermatozoides contenidos en su interior al medio de cultivo de la placa.

.- Se buscan los espermatozoides liberados en el medio de cultivo. La identificación se realiza con el microscopio invertido a 40x (figura 7a). Los espermatozoides testiculares generalmente sólo muestran una débil movilidad, aunque a veces se observan espermatozoides con movilidad progresiva (figura 7).

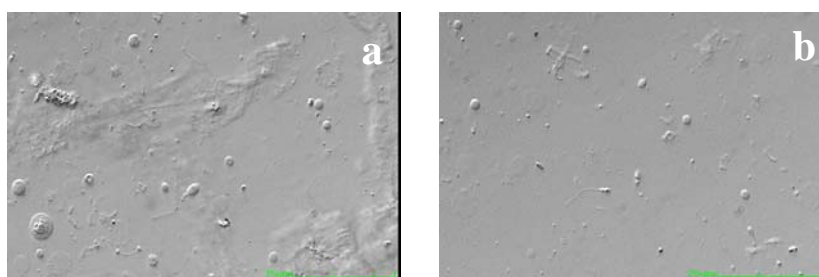


Figura 7: Búsqueda (a) e identificación de espermatozoides (b) en tejido testicular

.- En caso de no encontrar espermatozoides, se toma otra muestra de ese mismo testículo e, incluso, del otro si fuera necesario (como suele ocurrir en las azoospermias secretoras).

.- Se procede al cierre o sutura testicular con vicryl rapid 4-0.

Tras haber verificado la presencia de espermatozoides procedentes de biopsia testicular en el laboratorio, se procede a su criopreservación tras un lavado y preparación previa de la muestra. Se congela en forma de píldoras (haciendo orificios en hielo seco para dar la forma, y una vez congeladas, se pasan en un criotubo al recipiente de N₂ líquido, a -196°C), para asegurar varios ciclos, y se estudia cómo ha afectado dicho proceso descongelando una píldora.

El resultado varía desde una biopsia testicular en donde se encuentran espermatozoides con relativa facilidad (fácil), a otra en donde es más difícil la búsqueda (complicado) o, incluso, el resultado es negativo, no observándose ningún espermatozoide móvil al realizar la descongelación de varias píldoras. En los dos últimos casos la pareja ha de ser consciente de que en el ciclo se podría llegar a utilizar

semen de donante (si en una biopsia complicada hay una alta respuesta) en la totalidad de los mismos (biopsia negativa), por lo que han de tener firmados previamente los consentimientos de utilización de semen de donante.

La criopreservación tiene grandes ventajas. Al estar la muestra fraccionada en píldoras, se evita la repetición de posibles biopsias testiculares a pacientes que se someten a varios ciclos de ICSI, reduciendo así el riesgo de complicaciones, como inflamación o hematoma escrotal o intratesticular, infección de la herida quirúrgica, orquitis, e, incluso, dolor testicular persistente.

Además se asegura la disponibilidad de espermatozoides con anterioridad al inicio de la estimulación ovárica de la mujer, permitiendo así una independencia entre ambos procesos y evitando, por ejemplo, un ciclo innecesario a una mujer si no se han encontrado espermatozoides con anterioridad en el testículo del varón (siempre y cuando no estén dispuestos a utilizar semen de donante). Antes había que sincronizar la punción folicular con la biopsia testicular, con todos los problemas que este hecho generaba, aunque en la actualidad todavía hay algún ciclo en donde se producen las dos intervenciones el mismo día (sobre todo por problemas “de bloqueo” e imposibilidad de la obtención de la muestra por parte del varón, y de manera más reciente por alto grado de fragmentación del ADN espermático).

La utilización de la pentoxifilina en los últimos años en el laboratorio de reproducción asistida, ha ayudado bastante a la identificación de los espermatozoides móviles y, por tanto, vivos, en una muestra muy pobre, como suele ocurrir en la mayoría de las que proceden de biopsias testiculares, facilitando en gran medida el trabajo de búsqueda y selección de los espermatozoides por parte del biólogo.

La pentoxifilina: PTX: 1-9 (5-oxohexil)-3-7-dimetilxantina, al igual que otros derivados de la metilxantina, como la cafeína y la teofilina, actúa como inhibidor de la actividad fosfodiesterasa del 3'-5'-adenosin monofosfato cíclico (AMPC). Este hecho, conocido hace más de 20 años, produce el aumento de la concentración de AMPC intracelular, provocando un marcado aumento de la movilidad espermática (74).

La ondulación del flagelo del espermatozoide genera fuerzas activas a lo largo de éste que resultan en un movimiento progresivo del gameto. La generación de dicha fuerza propulsiva depende, en gran medida, de la disponibilidad energética (ATP) del espermatozoide. El ATP (adenosín trifosfato) es un constituyente celular necesario para la movilidad espermática. La conversión de ATP a AMPc está catalizada por la adenilciclase y la de AMPc a AMP por la fosfodiesterasa. Por tanto, con la inhibición de la fosfodiesterasa, aumentará la concentración de AMPc, incrementando la movilidad espermática, relacionada estrechamente con su capacidad fecundante.

Otros efectos de la pentoxifilina sobre los espermatozoides podrían ser la inducción de la reacción acrosómica y la inhibición de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Algunos autores demuestran que la PTX provoca un marcado aumento en el número de espermatozoides móviles. Otros defienden que el efecto no es sobre el porcentaje de espermatozoides móviles, sino sobre la velocidad o las características de la movilidad. Aunque aún no está claro cual de estas posturas es la cierta, lo que sí es seguro es que la PTX produce una modificación de la movilidad espermática, teniendo un efecto inductivo en su hiperactivación. Hasta la fecha no se ha comprobado que la pentoxifilina pueda aumentar la tasa de malformaciones.

5.- Inyección de espermatozoides en el límite de la normalidad o anormales: La teratozoospermia, tanto en el límite de la normalidad como no, es debida a la combinación de varias anomalías morfológicas que afectan a la función espermática. Hay estudios que obtienen bajas tasas de fecundación cuando se inyectan espermatozoides con cabezas anormales (globozoospermia y cabezas “de alfiler”), problemas en la unión de la cabeza al cuello, fragilidad del cuello, más de un flagelo y otros problemas asociados a la misma teratozoospermia, como el estado de compactación de la cromatina y la maduración, que podrían estar relacionados con la infertilidad y el aborto en el primer trimestre (75).

6.- Inyección de espermatozoides inmóviles: En algunos casos todos los gametos están inmóviles, astenozoospermia total, por presentar, por ejemplo, problemas en la arquitectura de los microtúbulos que forman el flagelo, como ocurre en el síndrome de Kartagener. La inyección de estos espermatozoides es responsable de tasas negativas en la fecundación, pues se desconoce si realmente están vivos o no, ante la imposibilidad

logística de poder realizar una prueba de viabilidad espermática, como un test hipoosmótico.

7.- Otras posibles causas: En ocasiones la presencia de algunos de los factores estudiados no es suficiente para explicar un fallo de fecundación, pues podría haber un efecto sinérgico entre varios de ellos. Tras evaluar todos los parámetros y no encontrar una causa aparente, la búsqueda de una explicación convincente es muy complicada, pues si se trata de un hecho ocasional el motivo podría residir en un nivel realmente complejo de abordar en la práctica habitual del laboratorio de FIV, como los problemas a nivel molecular: los defectos en la activación ovocitaria y los comentados anteriormente: fallos en la descondensación de la cabeza del espermatozoide y formación anormal de los pronúcleos, entre otros.

V.2.3.- FIV versus ICSI

La utilización de la ICSI como la técnica de reproducción asistida elegida en casi todos los casos nos plantea una serie de preguntas a las que aún no hay respuestas. ¿Se debería realizar una ICSI en todos los casos en que está indicada una FIV? (cada vez menos). Según algunos autores (76) se debería contestar de manera afirmativa antes de decidir hacer una ICSI a todos los casos, a las siguientes cuestiones: ¿es la fecundación normal y la división embrionaria mejor con la ICSI que con la FIV?. ¿Con la ICSI se podrían disminuir los casos de fallo de fecundación inesperada que se observan con la FIV?. ¿Es el potencial de implantación embrionaria similar tras FIV e ICSI?. ¿Existen más problemas durante el embarazo y con los niños nacidos tras ICSI que tras FIV?. Parece ser que en la actualidad contestar a todas las preguntas de manera afirmativa es muy poco probable, así pues cabe plantearse si realmente es la ICSI (figura 8) la solución en determinados ciclos, de ahí el auge de la técnica mixta, que a igualdad de calidad transferiría los embriones procedentes de FIV (figura 9).



Figura 8: ICSI

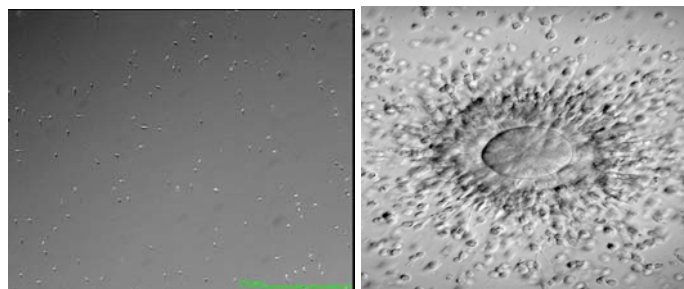


Figura 9: FIV

A pesar de que algunos autores apoyan el uso de la ICSI para todas las indicaciones (77), puesto que en un principio suponía la alternativa sólo para casos de factor masculino severo, otros autores (71) tienen sus dudas sobre todo en pacientes de edad avanzada, con baja respuesta, con parámetros seminales normales y sin ciclos previos de fallo de fecundación con FIV, pues es una forma de reducir los posibles problemas técnicos que pueden tener lugar durante el proceso de la microinyección, reduciendo a su vez el riesgo de dañar a los ovocitos de mala calidad, que son más frágiles o tienen una zona pelúcida más resistente.

La técnica de la ICSI puede originar la degeneración de algunos ovocitos, los denominados “lisados”, pues a veces es inevitable debido a problemas técnicos o a las características propias del citoplasma; además la microinyección es un procedimiento delicado que puede dañar estructuras citoplasmáticas en el ovocito, causando un detrimento en el desarrollo embrionario (78) si no se hace adecuadamente. Incluso algunos autores (79) han descrito las diferentes dificultades que una persona puede encontrar cuando realiza una microinyección, concluyendo que las anomalías cromosómicas de la zona pelúcida y del citoplasma, junto a ciertos problemas técnicos, afectan negativamente a la supervivencia del ovocito después de la ICSI. Los ovocitos de mala calidad, que aparecen más frecuentemente en mujeres añosas, pueden ser más sensibles al daño celular.

No es posible saber si los ovocitos que experimentan una ruptura rápida se fecundarían con una FIV, pero es esperable que este tipo de ovocitos tengan una mayor tasa de supervivencia con dicha técnica si la comparamos con la ICSI (y por tanto una mayor tasa de fecundación), ya que el procedimiento es menos invasivo y traumático.

Aunque está descrito que la exposición del ovocito a un medio con abundantes espermatozoides, como ocurre en la FIV, podría ser deletéreo en términos de fecundación y división embrionaria, ya que se expone a una alta concentración de enzimas espermáticas que pueden ejercer un efecto negativo sobre él (80), pues de manera natural tan sólo unos 200 espermatozoides llegarían a las trompas de Falopio, la ICSI también presenta su problemática.

En primer lugar la elección del espermatozoide es arbitraria y al azar, realizada por el embriólogo y basada fundamentalmente en la observación del movimiento y morfología espermáticos y no en su competencia natural. En segundo lugar el proceso de selección y captura del espermatozoide que será inyectado supone la exposición a estímulos físicos y químicos no fisiológicos, como el trauma sobre el flagelo para su inmovilización, la luz del microscopio y medios de cultivo especiales que frenan su movimiento (PVP).

Por otra parte, el ovocito antes de ser inyectado se somete a una manipulación enzimática y mecánica para ser desprovisto de las células del cúmulo e identificar su estado de madurez y la ubicación del primer corpúsculo polar (CP). Dicha manipulación, en la que se desprende del ovocito las células del cúmulo, podría llevar consigo la interrupción brusca del diálogo entre gameto y células foliculares, perturbando la maduración final del ovocito.

La descripción de la técnica de la ICSI exige tomar como punto de referencia para ubicar el huso meiótico ovocitario, el lugar donde se encuentra el primer CP. Esta recomendación busca evitar la inyección del espermatozoide sobre el huso, previniendo daños sobre tal estructura. Sin embargo, en ocasiones, la manipulación ovocitaria previa puede desplazar la ubicación original de dicho CP y alterar su relación con el huso.

La propia micromanipulación conlleva varias consideraciones: la rotura de la ZP, la membrana ovocitaria, estructuras citoplasmáticas, el depósito intraovocitario de material extraño al proceso fisiológico de fertilización, y ya no solo de estructuras procedentes del espermatozoide, sino de material extracorpóreo como medios de cultivo, PVP, etc.

La necesidad de que el ovocito se encuentre en M-II, es decir, maduro, para lograr su fertilización, estrecha los márgenes horarios en los que se puede microinyectar. A pesar de ser posible la maduración “in vitro” de ovocitos, los resultados empeoran conforme se prolonga el periodo de incubación en el laboratorio preciso para alcanzarla (71).

En la ICSI el espermatozoide seleccionado es directamente colocado en el interior del ovocito, atravesando en un solo paso las envolturas de la célula materna e introduciendo el gameto masculino íntegro, con el acrosoma y su contenido intactos y la teca perinuclear al citoplasma. Esta maniobra de inyección sustituye los pasos descritos de interacción entre gametos, como la reacción acrosómica, la unión del espermatozoide a la ZP, la penetración e interacción de membranas ovocitaria y espermática, etc.

La activación ovocitaria que se observa en la ICSI sugiere que ciertos componentes espermáticos pueden desencadenarla, aun en ausencia de interacciones de membrana. Sin embargo, existen diferencias en los eventos de activación cuando se comparan con los descritos en FIV. Una de ellas es el inicio de las oscilaciones de calcio, retrasado de 30 minutos a varias horas. Este hallazgo es consistente con la observación de otros eventos como la extrusión del segundo CP y la formación pronuclear, muy variables entre ovocitos que son inyectados en momentos similares. El retraso puede ser explicado por el mayor tiempo requerido para romper la membrana plasmática del espermatozoide y remover el acrosoma para exponer el factor espermático activador del ovocito presente dentro de la teca perinuclear (81).

La formación del áster espermático a partir del centrosoma, la organización microtubular y la aposición pronuclear después de la ICSI se llevan a cabo a pesar de no haber logrado una descondensación completa del ADN. La presencia de cromosomas sexuales en la región apical de la cabeza espermática, lugar donde el proceso de descondensación es retrasado, puede relacionarse con el incremento en las tasas de alteraciones cromosómicas sexuales sugerido en recién nacidos de microinyección. Además es posible que el ligero aumento de las anomalías cromosómicas tras la ICSI esté relacionado con una forma atípica de activación ovocitaria, propia de dicha técnica de reproducción asistida (6), aunque no existen argumentos suficientes para establecer una relación de causa-efecto inherente a la técnica.

La síntesis de ADN en ICSI se inicia sólo cuando el espermatozoide completa su descondensación y parece ocurrir de manera sincrónica en ambos pronúcleos. Esto representa un retraso cuando se compara con embriones obtenidos por FIV. Además los gránulos corticales que normalmente sufren exocitosis después de la activación ovocitaria, pueden ser retenidos dentro del citoplasma después de la microinyección. Aunque son eventualmente degradados o perdidos, se desconoce si la retención de tales residuos puede ocasionar efectos posteriores en el desarrollo. Igualmente es incierto el efecto que tiene el ingreso del contenido acrosómico en el citoplasma ovocitario, y además hay que tener en cuenta que la ICSI, a diferencia de otros procedimientos terapéuticos aplicados en humanos, no ha venido precedido de una amplia experiencia animal.

La mayoría de publicaciones hacen referencia a la ICSI como un procedimiento seguro, afirmación apoyada en las altas tasas de fecundación y embarazo y en la incidencia de malformaciones congénitas mayores y menores comparables a las obtenidas en FIV (82, 83). También hay que tener en cuenta que, aunque es llamativo el hallazgo de un ligero incremento en la incidencia de alteraciones cromosómicas “de novo” en nacidos de ICSI, su causa no ha sido completamente aclarada, no pudiendo culpar a la técnica en sí, sino más bien a las propias características de la población infértil, pues el cariotipo de los varones con azoospermia y criptoospermia es anómalo en un 7% si lo comparamos con el 0,4% de la población fenotípicamente normal; además estudios realizados con FISH de espermatozoides revelan que varones infértiles con cariotipo normal presentan una mayor tasa de anomalías cromosómicas, como las aneuploidías.

También es conocida la existencia de microdeleciones en el cromosoma Y en un 3-15% de estos varones y su transmisión a la descendencia varonil o la existencia de mutaciones relacionadas con la fibrosis quística en varones con agenesia de conductos deferentes (84). Por tanto, es necesaria una correcta evaluación clínica del varón infértil y un estudio genético previo al ciclo como un cariotipo, aunque la ICSI y su posible riesgo genético seguirá siendo tema de debate, por lo que también es recomendable realizar el diagnóstico genético prenatal mediante amniocentesis en los embarazos tras microinyección.

La ICSI es una técnica, por tanto, fiable, efectiva y, razonablemente segura, y que, a pesar, de que económicamente es más cara que la FIV, es totalmente aconsejable en todos los anteriores supuestos e indicaciones, tanto pura como mixta, excepto en casos en los que hay pocos ovocitos, de aspecto inmaduro y con una calidad seminal buena, sin fallo previo de inseminación o FIV. Las indicaciones de una u otra técnica de fecundación no sólo deben establecerse “a priori”, sino que casos inicialmente susceptibles de ICSI ó FIV deben ser reconsiderados según las características de los gametos, espermatozoides y ovocitos, el mismo día de la punción. Así pues, es fundamental el seguimiento constante de los datos, de si es mejor aplicar FIV ó ICSI en un determinado ciclo, ya que al fin y al cabo es la experiencia de cada grupo y la medicina basada en la evidencia la que nos hará decidir por una u otra técnica.

V.3.- POSIBLES SOLUCIONES AL FALLO DE FECUNDACIÓN

Ante un fallo total de fecundación en FIV cabe la alternativa de rescatar los ovocitos no fecundados mediante ICSI (85, 86), aunque con resultados muy pobres, o dar por cancelado el ciclo, que es lo recomendable, e intentar una ICSI en una próxima ocasión (87). En los fallos de ICSI la única opción es seguir realizando microinyección (88). Si persiste el fallo, habrá que cambiar de gameto.

Cuando se produce un fallo de fecundación puede recomendarse un nuevo ciclo con gametos propios, pues hasta en el 82,64% de los ciclos realizados posteriormente en nuestra clínica en las mismas parejas estudiadas se consiguen embriones (y embarazos en más de una quinta parte), siempre y cuando no haya un resultado de FISH o de fragmentación de ADN espermático alterado.

Hasta en un 45% (22 de 49) de los varones que han tenido muy baja tasa de fecundación o fallo total se observa un FISH alterado, cuando en el total de casos, como el factor masculino, abortos de repetición, mala calidad embrionaria, no embarazo, mixta, factor femenino, cariotipo anómalo y sin indicación, ronda el 23% (56 de 239). En las siguientes figuras se observa un ejemplo de FISH alterado en espermatozoides, en este caso una disomía sexual (figura 10), y un FISH normal (figura 11).

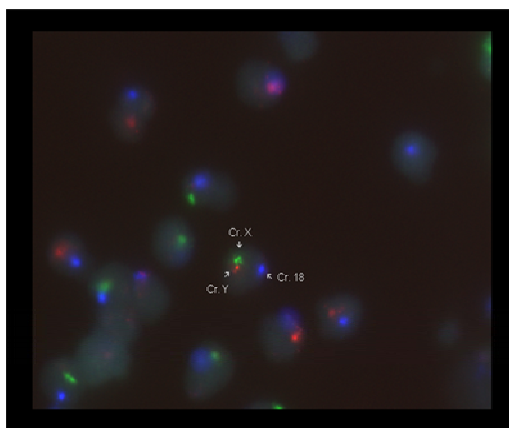


Figura 10: FISH alterado

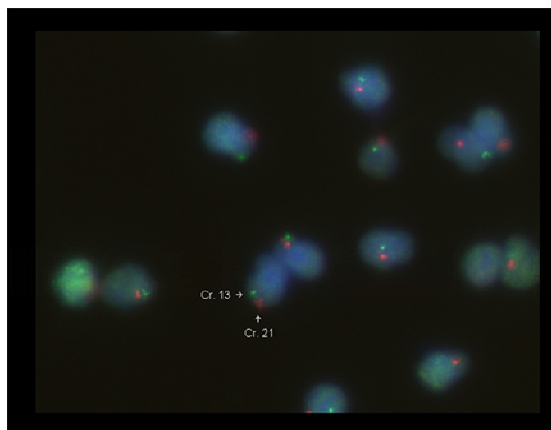


Figura 11: FISH normal

Estos datos se han obtenido en nuestra clínica tras analizar el FISH en espermatozoides de 288 pacientes entre los años 2006 y 2008, con las indicaciones anteriormente expuestas. La incidencia de un FISH alterado en el grupo de fallo total de fecundación y fecundación muy baja supone el 28,20% (22 de 78) del total de FISH anómalos, mientras que los normales son el 12,86% (27 de 210), y comparándolo con las demás indicaciones presenta un resultado estadísticamente significativo ($p=0,002$).

Con un FISH alterado en espermatozoides se ofrecen 3 soluciones: semen de donante, continuar con la misma muestra, sabiendo que puede ocurrir lo mismo, o realizar un ciclo de DGP, aunque en casos de fallo total de fecundación no es lo más recomendable, pues hacen falta varios embriones para poder analizarlos.

Con una fragmentación alta del ADN espermático (valores superiores al 30% en tiempo “0”) se puede proponer al paciente un tratamiento de varios meses con antioxidantes, por si la causa fuera el exceso de radicales libres, la microinyección espermática inmediata tras la capacitación de la muestra (la fragmentación aumenta con el tiempo), o una biopsia en fresco (los espermatozoides en el testículo tienen una menor fragmentación del ADN) antes de pasar a realizar ciclos con semen de donante.

Una buena solución para los casos de baja respuesta y factor etario sería la donación de ovocitos, que en los últimos años está siendo muy demandada, consiguiéndose altas tasas de gestación. Junto con el fallo ovárico prematuro, serían las

indicaciones más frecuentes, que se pueden dividir en dos grandes grupos, en función de la ausencia o presencia de función ovárica (3).

A.- Mujeres sin Función Ovárica: Hay tres grupos:

1.- Fallo Ovárico Primario: Este grupo incluye principalmente a mujeres con disgenesia, o anomalía en el desarrollo, gonadal por una alteración numérica o estructural de los cromosomas (89).

2.- Fallo Ovárico Prematuro: Es el fallo de la función ovárica que se produce antes de los 40 años de edad. Se han descrito diferentes factores etiológicos implicados: hereditarios, alteraciones enzimáticas (defectos en la secreción de gonadotropinas), trastornos autoinmunitarios, factores infecciosos (parotiditis, rubéola), ambientales (tabaquismo) y causas iatrogénicas por cirugía, quimioterapia o radiación.

3.- Menopausia: El futuro de un hijo con una madre de edad avanzada ha despertado diversos debates médicos y éticos. La edad límite de una receptora de ovocitos podría situarse en los 50 años en la clínica Ginefiv.

B.- Mujeres con Función Ovárica: Hay cinco grupos:

1.- Mujeres con anomalías genéticas

2.- Fallos repetidos en FIV: Se podrían considerar varios subgrupos:

2a.- Mujeres que no responden a la estimulación ovárica o “bajas respondedoras”. Se asocian a posibilidades muy bajas de gestación con otras técnicas de reproducción asistida, siendo la donación de ovocitos una alternativa con muy buenos resultados.

2b.- Fallo de fecundación en repetidas ocasiones con la ICSI. Se cambia el gameto cuando ocurre algo así, en este caso el femenino, pues los ovocitos serían los responsables del fallo de fecundación. Siempre teniendo en cuenta que no se trate de un factor masculino muy severo y que los estudios genéticos realizados al varón sean normales.

2c.- Fallo repetido de implantación (FRI): Es una alternativa el cambio de gameto femenino cuando se transfieren varios embriones de buena calidad en, al menos tres ciclos, siempre y cuando el útero y el endometrio sean normales.

2d.- Mala calidad ovocitaria: En, al menos, dos ciclos de FIV. La mala calidad del gameto puede originar una mala calidad del embrión.

3.- Mujeres con ovarios técnicamente inaccesibles.

4.- Mujeres mayores de 40 años con ciclo menstrual normal.

5.- Abortos de repetición: Casos de pérdidas gestacionales repetidas e inexplicables.

En muy pocas ocasiones se dan fallos totales de fecundación generalizados, y menos todavía en ambas técnicas a la vez. En estos casos se ha de hacer un estudio completo y exhaustivo de todos los factores que podrían afectar de manera simultánea a ambos gametos, como medios de cultivo en mal estado, pésimas condiciones de cultivo, rotura de las condiciones óptimas; también se deberían revisar todos los lotes de los medios de cultivo, superficies calefactadas, material fungible, equipamiento de quirófano para punción folicular, cabinas de flujo laminar (figura 12), medición diaria de niveles de CO₂ y temperatura en los incubadores (sustituyendo los de una sola portezuela -figura 13-, por portezuelas individuales -figura 14-), instalaciones y especificaciones de gases utilizadas, es decir, todo lo que pudiera ser común a todas las técnicas y procedimientos realizados en un laboratorio de FIV.



Figura 12: Cabina de flujo laminar con superficie calefactada y sistema de CO₂ acoplado.



Figura 13: Incubador tipo BB6060, con 1 portezuela.



Figura 14: Incubador tipo C200, con portezuelas individuales.

Con la presencia de las nuevas y no invasivas tecnologías aplicadas al laboratorio de FIV, podemos visualizar con más detalle ambos gametos: la IMSI (Intracytoplasmic Morphology selected Sperm Injection, o inyección intracitoplásmica de espermatozoides morfológicamente seleccionados) para el masculino (90, 91) y el Oosight o PolScope para el femenino (92, 93, 94).

La IMSI aplicada a la microinyección espermática permite observar estructuras del espermatozoide hasta a 6000x, es decir, 10x del ocular y 600x del nuevo objetivo (figura 15), visualizando características que se podrían pasar por alto con una selección normal a 400x (figura 16), como la existencia de vacuolas (figura 17). Tras ello se puede seleccionar el espermatozoide (figura 18).

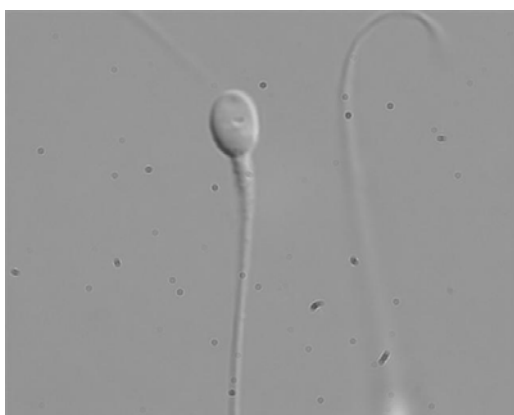


Figura 15: Espermatozoide a 6000x visto mediante la IMSI.

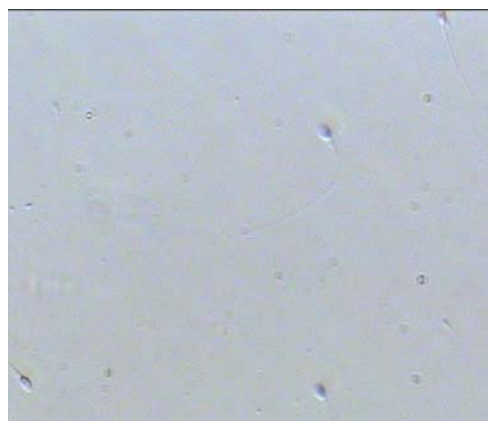


Figura 16: Espermatozoides a 400x vistos en una ICSI normal



Figura 17: Vacuolas en espermatozoides a 6000x

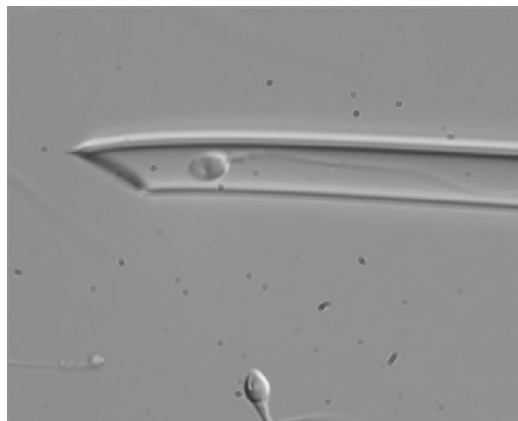


Figura 18: Selección del espermatoziode con IMSI

Con el Oosight, microscopio de luz polarizada, se permite la perfecta visualización de la zona pelúcida (ZP) del ovocito, medida como “retardancia” en nanómetros (figura 19), así como la localización exacta del huso mitótico o acromático (“spindle”) (figura 20), pudiendo impedir la ruptura de la placa metafásica cuando se realiza la microinyección, pues a pesar de guiarnos por el corpúsculo polar en algunas ocasiones no coinciden ambos. El microscopio va unido a un sistema de software capaz de calcular la densidad de las estructuras que visualizamos, pudiendo utilizar dichas medidas como nuevos marcadores de calidad ovocitaria: un huso y una membrana interna de la ZP más densos son buenos indicadores.

El huso acromático está formado por microtúbulos que son muy sensibles a los cambios ambientales, como la temperatura. La ruptura del huso puede ser debida a dichas condiciones, o a la propia degeneración del ovocito (edad, genética e, incluso, una inapropiada estimulación ovárica) y puede estar relacionada con el aumento de aneuploidías.

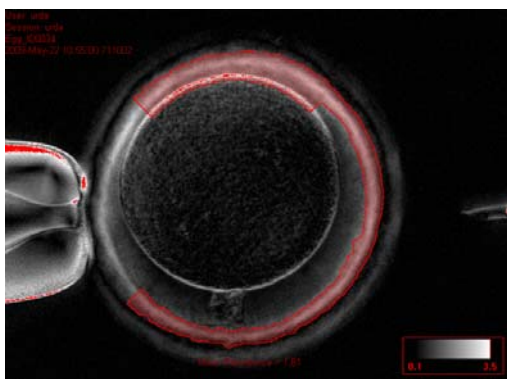


Figura 19: Visualización de la ZP

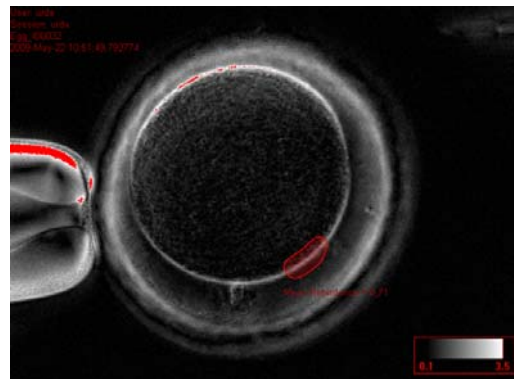


Figura 20: Visualización del huso acromático

V.4.- POSIBLES CAUSAS DE FALLO DE FECUNDACION EN LOS CICLOS ESTUDIADOS

En los 206 casos de fallo de fecundación estudiados, se podría encontrar respuesta en muchos de ellos (gráfica 53). Esta división se ha realizado descartando en primer lugar todos los ciclos con baja respuesta, independientemente de otros factores, y así sucesivamente. Es decir, de 206 ciclos hay 91 con baja respuesta, del resto hay 56 que se podrían explicar por un factor masculino, y así hasta el final.

- Hay 91 ciclos con un número de ovocitos obtenidos igual o inferior a 3: Baja respuesta, lo que supone el 44,17%.

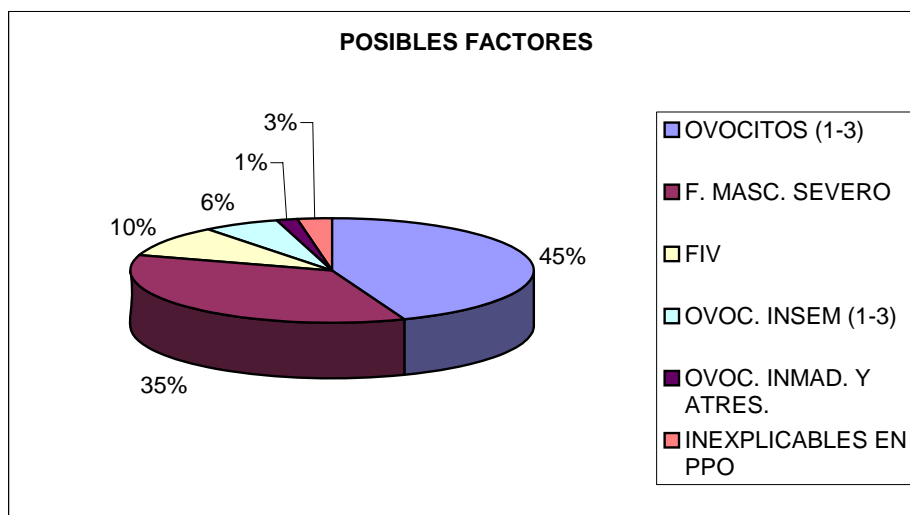
- Factor masculino severo, en 56 ciclos o muy severo (17) en 73 ciclos más: 35,44%

- Hasta 20 ciclos se han realizado con la técnica de FIV convencional, pudiendo haberse producido el fallo de fecundación por la imposibilidad del espermatozoide de penetrar el ovocito, por un posible defecto en la interacción entre el gameto masculino y la ZP del gameto femenino, es decir, un 9,71%.

- En 13 ciclos se han inyectado o inseminado un número de ovocitos igual o inferior a 3, por gran cantidad de inmaduros o atrésicos: Factor ovocitario, un 6,31%.

- De los 9 ciclos restantes, otros 3 (1,46%) se podrían explicar porque han madurado “in vitro” varios ovocitos que al final se han podido inyectar. Ha podido haber una maduración nuclear, pero quizás no citoplasmática: Un caso tenía sólo 1 M-II y se inyectaron 4; otro tenía 4 M-II y maduraron otros 3 y en otro caso, de 13 ovocitos,

sólo había 5 maduros y al final se inyectaron 8 más; en todos estos ciclos el número de ovocitos maduros tras la decumulación era inferior a la mitad (gráfica 52).



Gráfica 52: Posibles causas o factores en el fallo de fecundación en el grupo estudiado

.- En tan sólo 6 ciclos de los 206, lo que supone el 2,91% del total de los fallos de fecundación, no hay una explicación razonable de por qué ha habido dicho fallo, pues son mujeres jóvenes, con buena respuesta y factor masculino leve. Es en estos casos, difíciles de explicar, en donde hay que estudiar todos los factores con mucho más detalle, para intentar dar con la solución lo más pronto posible.

Estudiados más a fondo los 6 ciclos obtenemos los siguientes resultados:

- .- Edad: Media: $31 \pm 2,68$, y rango de 26 a 33 años.
- .- FSH (mUI/ml ó UI/l): Media: $7,18 \pm 1,47$; rango: 5 a 8,6.
- .- Ovocitos obtenidos: $7,5 \pm 1,38$; rango: 6 a 9.
- .- Ovocitos inseminados: $5,5 \pm 1,05$; rango de 4 a 7.
- .- T.R.A.: 3 mixtas y 3 ICSI.
- .- Indicación: Masculina* (4), mixta (1) y femenina (1). *El día de la punción no existe un factor masculino severo.
- .- Indicación femenina: En un caso: SOP, tubárica y cervical y en el otro, SOP.
- .- Esterilidad: Todas primaria, sin embarazo previo, en la primera consulta, con $1,83 \pm 0,75$ de media de años de evolución y rango de 1 a 3.
- .- Biólogo: En 5 de los 6 casos han inseminado dos biólogos diferentes.

.- Número de Ciclo: En 5 parejas suponía el primer ciclo de FIV/ICSI y en 1 era el segundo, habiendo tenido un bajo porcentaje de fecundación en el primero. También se hizo inseminación conyugal en cuatro de las parejas anteriormente, habiéndose logrado un embarazo que acabó en aborto.

.- Ciclos posteriores: Dos de las parejas no volvieron; en otra hubo un segundo fallo de fecundación: se cambió el gameto femenino y hubo embarazo; en otras dos parejas también se consiguió la gestación, una con un ciclo propio (embarazo gemelar) y otra con recepción ovocitaria; la última pareja, tras tres ciclos (el último un DGP), no consiguió embarazo.

Es decir, que de los 4 casos, con una causa aparente en principio difícil de explicar que han seguido haciendo ciclos posteriormente al fallo de fecundación, se ha conseguido embarazo hasta en 3 de ellos, pero se ha tenido que cambiar de gameto (en ambos casos el femenino) en 2. El último caso, posiblemente también hubiera gestado con ese cambio, pero la decisión no es siempre bien acogida por la pareja, que intenta agotar todas las posibilidades de conseguir un hijo biológico.

V.5.- VARIABLES ESTUDIADAS SÓLO EN EL GRUPO DE EMBARAZADAS

De cada 100 ovocitos inseminados sólo 63 (porcentaje de fecundación viable del 63,75%) están bien fecundados en D+1, y de éstos aproximadamente 54 (86,38% de viabilidad embrionaria en D+2 ó D+3) llegarán a ser considerados como embriones viables, presentando muy buena o buena calidad el 62,19%, es decir, apenas 34 de los ovocitos iniciales tendrán buenas tasas de gestación en un grupo en el que todos los ciclos han acabado en embarazo.

Hemos de tener en cuenta que no todos los embriones con buenas perspectivas de embarazo (primera y segunda calidad) se han podido transferir: sólo el 64,26%, o lo que es lo mismo, casi 22 de los 100 ovocitos iniciales se han convertido en buenos embriones que se han transferido en fresco; el resto se han criopreservado para futuros ciclos, pues el número de embriones transferidos ha sido en la mayoría de los casos (76,25%) de dos, siendo mínimos los ciclos con un solo embrión transferido (10,25%) y

algunos más los de tres (13,5%), pero sólo en circunstancias especiales. Hasta el 67,25% de las pacientes han podido criopreservar los embriones sobrantes de su ciclo.

En un futuro no muy lejano se tenderá a transferir menos embriones (la media ha sido de 2,03 embriones/ciclo), intentando disminuir las tasas de embarazos múltiples sin reducir las tasas de gestación, por lo que la selección embrionaria ha de ser muy exhaustiva y los protocolos de congelación y descongelación embrionaria (actualmente vitrificación y desvitrificación) perfectamente diseñados para ofrecer las máximas garantías posibles en todos los embriones viables de un ciclo, aunque, lógicamente, los embriones descongelados tienen tasas inferiores de embarazo que los transferidos en fresco.

La media de los ovocitos inseminados ha sido de 7,37; la de embriones en D+1 de 4,7 y la de embriones viables en D+2 y D+3 de 4,06/ciclo, llegando a una media de 0,84 embriones de primera calidad y 1,68 de segunda por ciclo.

V.6.- VARIABLES ESTUDIADAS SÓLO EN EL GRUPO CON FALLO DE FECUNDACIÓN

Hasta en un 56,31% de los pacientes con fallo de fecundación se produce en un primer ciclo, un 27,18% en el segundo y sólo un 1,94% en un tercero; se contabiliza hasta casi el 7% (6,79%) las ocasiones en que anteriormente se ha tenido que cancelar un ciclo en estos mismos pacientes, por baja respuesta, crecimiento anómalo de los folículos, etc, y como dato importante: hasta casi un 8% (7,76%) de estas parejas han tenido embarazos anteriores en reproducción asistida en la clínica Ginefiv, lo que vuelve a dar idea de que cada ciclo es diferente.

En cuanto a los ciclos de FIV/ICSI anteriores estudiados en el grupo con fallo de fecundación se han verificado un total de 97 en 80 parejas (el 38,83%), consiguiéndose llegar a la transferencia embrionaria en 65 de ellas (81,25%) y al niño sano en casa en tan sólo 6 ocasiones de los 17 embarazos finales (tasa de gestación/señora del 26,15%); estos datos suponen un éxito del 35,3% frente al elevado 64,7% de aborto y de

únicamente un 6,19% si se contabilizan los 97 ciclos iniciados, lo que da idea de la dificultad del embarazo a término en este tipo de pacientes.

Además si se cuentan también los ciclos anteriores de IAC: de 109 tratamientos realizados en la clínica Ginefiv en 36 pacientes (un 17,48% del total del grupo) tan sólo en 1 ocasión (0,92%) ocurrió el embarazo, que terminó en aborto, datos que ponen de manifiesto, una vez más, que este grupo es realmente complejo de tratar con éxito.

Si estudiamos además, los ciclos posteriores que se han realizado este tipo de parejas, observamos los siguientes datos: de las 206, hasta 80 no volvieron a la clínica, pero se conoce de la existencia de, al menos 4 gestaciones espontáneas, una acabada en aborto. De las 126 parejas restantes, 125 realizan al menos un ciclo de FIV/ICSI (1 se canceló por baja respuesta) y otra se hizo un ciclo de IAD (Inseminación Artificial de Donante). Hasta 24 de las 124 (19,35%) hicieron más de un tipo de ciclo, es decir, de gametos propios y de donación (sólo uno o ambos): un total de 207, repartidos entre 121 propios (58,45%) y 81 (41,55%) de “donación”, de los que hubo transferencia embrionaria en el 85,99% (178).

En los ciclos posteriores al fallo de fecundación con gametos propios (121) se observó un nuevo fallo en el 17,36% (21), pero también hubo 28 embarazos (23,14% de tasa de gestación/ciclo), con un 61,71% de evolución a término (17). En los restantes 81 ciclos, de “donación”, se consiguieron 32 embarazos (37,21%), con un 78,13% (25) de “niño sano en casa”.

Aunque hay diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de embarazo/ciclo ($p: 0,028$), no se da en la tasa de evolución ($p: 0,14$) si comparamos ciclos posteriores con gametos propios o donados en parejas con fallo de fecundación. Se puede recomendar realizar otro ciclo a estas parejas teniendo en cuenta que en más del 80% de los ciclos posteriores se consiguen embriones, y hasta embarazo en casi la quinta parte, siempre y cuando un resultado de FISH y fragmentación espermática sean normales. Hay que intentar agotar todas las posibilidades para conseguir un hijo biológico, pero con dos fallos de fecundación lo más recomendable es cambiar de gameto (95).

V. 7.- FORMULA PREDICTIVA CON CINCO VARIABLES

Como se ha demostrado en otro trabajo (96) los resultados obtenidos tras la aplicación de la fórmula predictiva de las posibilidades de gestación en un ciclo de FIV/ICSI son acordes a las variables estudiadas; es decir, un ciclo en donde la paciente no es muy mayor, con FSH no demasiado elevada y un buen número de folículos, ovocitos y, sobre todo, ovocitos inseminados tiene una posibilidad alta de gestación. Por el contrario, una mujer añosa, con alta FSH y escasa respuesta tiene muchas menos posibilidades de quedarse embarazada. Dicho de otro modo, cuando el resultado que se obtiene es una baja posibilidad de obtener gestación, esta paciente tiene unas probabilidades muy bajas de obtener embarazo en este ciclo, y cuando el resultado es de una gran probabilidad, la mujer tiene unas altas probabilidades de embarazarse.

Sin embargo, en determinados casos con altas posibilidades de gestación el resultado quizás no sea el de embarazo. Ello es debido a que en esta fórmula predictiva no se ha tenido en cuenta variables tan importantes como la calidad de los embriones y de la transferencia, así como el grosor del endometrio, es decir, que haya una buena interacción entre éste y el embrión para que se pueda producir la implantación. Tampoco se ha considerado la calidad seminal ni un posible riesgo de hiperestimulación ovárica que obligaría a cancelar la transferencia en fresco, criopreservando los embriones y disminuyendo, así, las posibilidades de gestación.

El modelo de regresión logística estudiado pone de manifiesto el potencial pronóstico de las cinco variables y determina cuál es la mejor predictora de embarazo. En nuestro caso, se le da más importancia al número de ovocitos inseminados, teniendo los folículos y los ovocitos obtenidos una asociación positiva con el embarazo y la edad y la FSH una asociación negativa, aunque su valor predictivo es menor.

Como se ha estudiado ya (97) el número de folículos maduros es un factor predictivo importante de la cantidad de ovocitos recuperados y, por tanto, de las posibilidades de embarazo. Los folículos en crecimiento tienen una relación directa con los folículos restantes y la reserva ovárica (98).

La predicción del resultado de un ciclo en base a la edad materna también ha sido valorado, pues la fecundidad disminuye con respecto a ella, iniciándose a finales de la década de los 20, y siendo más acusada hacia el final de la década de los 30. A mayor edad, menor reserva ovárica y, por tanto, menor producción de ovocitos. Sin embargo en nuestros resultados, en el grupo de embarazadas hay una menor correlación entre la edad y los ovocitos obtenidos, comparándolo con el grupo con fallo de fecundación. La edad tendría un valor predictivo menor, pues es limitado cuando se considera de manera aislada (99).

En cuanto a los niveles de FSH, en el tercer día del ciclo, están relacionados con un número inferior de folículos y, por tanto, de ovocitos, pero tienen un valor predictivo menor de las posibilidades de gestación. Además su poder de predicción se ha de interpretar con respecto a otras variables (100). La razón podría encontrarse en que los niveles de FSH en el tercer día del ciclo se pueden alterar por varias circunstancias, como el momento de la extracción, ciclos irregulares y polimorfismos en el receptor de la FSH (101).

También unos niveles elevados de FSH indican una reserva ovárica disminuida en cuanto al número de ovocitos, pero no en cuanto a calidad, pudiendo haber pocos ovocitos pero todos viables. En nuestro estudio no hay una correlación significativa entre la FSH y el número de ovocitos inseminados en el grupo de las embarazadas. Los niveles de FSH en el tercer día del ciclo son un buen predictor del remanente de ovocitos más que de su calidad (102).

Por tanto podríamos concluir que es importante intentar saber o averiguar en qué medida puede influir en un ciclo cada uno de los factores estudiados (edad, reserva ovárica, respuesta ovárica, factor masculino, de laboratorio, etc.) y aconsejar a la pareja antes de comenzar el mismo si realmente merece la pena seguir adelante, sabiendo que la suma de dichas variables disminuye la posibilidad del embarazo, e incluso de que no haya embriones. Algunas de las razones que pueden desaconsejar la continuación del ciclo podrían ser los motivos económicos y los estadísticos para cualquier centro de reproducción asistida, pues siempre se trataría de casos con malos resultados.

VI.- CONCLUSIONES

De nuestros resultados se desprenden las siguientes conclusiones:

- 1.- Un ciclo de FIV/ICSI tiene un mal pronóstico en parejas estériles si la edad materna es superior a 37 años.
- 2.- Una baja reserva ovárica ($FSH > 10$ mUI/ml) en mujeres estériles es de mal pronóstico para la consecución de embarazo tras ciclos de FIV/ICSI.
- 3.- Una buena respuesta ovocitaria, entre 6 y 10 ovocitos maduros, evita muchos fallos de fecundación en parejas estériles, independientemente de la calidad del semen.
- 4.- Las parejas estériles con factor masculino y femenino concurrentes supone un factor de mal pronóstico, destacando que la endometriosis no es una indicación femenina clara que pronostique un fallo de fecundación.
- 5.- La calidad ovocitaria en ICSI, en base a los dismorfismos ovocitarios y la técnica de la microinyección no es determinante para que se produzcan fallos de fecundación en un ciclo.
- 6.- La técnica mixta desde un primer ciclo (con semen positivo para FIV y con varios ovocitos, inseminando los inmaduros e inyectando los maduros) es una buena opción para evitar fallos de fecundación.
- 7.- Un porcentaje de los fallos de FIV en parejas estériles son debidos a un problema en la interacción entre la zona pelúcida del ovocito y los espermatozoides, siendo la solución propuesta la ICSI.

8.- Tras un fallo de fecundación con ICSI en parejas estériles se podría realizar otro ciclo con gametos propios, siempre que el estudio genético del espermatozoide sea normal (FISH y fragmentación espermática).

9.- Nuestra experiencia aconseja que cuando el fallo de fecundación con ICSI en parejas estériles persiste, conviene cambiar de gameto.

VII.- BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Steptoe PC and Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978;2:336.
- 2.- Palermo G, Joris H, Devroey P and Van Steirteghem, AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoa into an oocyte. *Lancet*, 1992; 340: 17-18.
- 3.- Bosch E, Bellver J, Escudero E, Pellicer A, Rodríguez M, Vidal C, Gaytán J y Remohí J. Donación de ovocitos. En: Remohí J, Pellicer A, Simón C y Navarro J (eds). *Reproducción Humana*. Madrid. Mc Graw-Hill Interamericana de España S.A.U. 2ª ed. 2002: 489-498.
- 4.- Egozcue, J. Esterilidad masculina de causa genética. En: Remohí J, Pellicer A, Simón C y Navarro J (eds). *Reproducción Humana*. Madrid. Mc Graw-Hill Interamericana de España S.A.U. 2ª ed. 2002: 309-312.
- 5.- <http://www.rae.es/>. Real Academia de la Lengua.
- 6.- Mendoza C, Tesarik J. La fecundación: bases bioquímicas. En: Remohí J, Pellicer A, Simón C y Navarro J (eds). *Reproducción Humana*. Madrid. Mc Graw-Hill Interamericana de España S.A.U. 2ª ed. 2002: 393-399.
- 7.- <http://www.anatomohistologia.uns.edu.ar/plantilla.asp?zona=modrepro/>. Anatomohistología. Módulos. Aparato reproductor. Aimale MA, Corte MM y Gallego C.
- 8.- <http://www.encuentros.uma.es/encuentros29/29fecundacion.html/>. La Fecundación en el ser humano. Buch Tomé B.
- 9.- Gámiz P, Romero JL, Zulategui JF, Gadea B, Albert C y de los Santos Mª J. Valoración de la fecundación. En: Remohí J, Cobo A, Romero JL, Pellicer A, Simón C. *Manual Práctico de Esterilidad y Reproducción Humana*. Madrid. Mc Graw-Hill Interamericana de España S.A.U. 2ª ed. 2005: 392-402.

10.- http://www.tdr.cesca.es/TESIS_UM/AVAILABLE/TDR-1124105-133538//egr03de10.pdf/

11.- Coordinador: Belill I y Ochoa C. Ponentes: Veiga E, García M, Ron Corzo P, Huguet E, González B, Graña M y López MJ. Fecundación. En: Matorras R, Hernández J (eds): *Estudio y Tratamiento de la pareja estéril: Recomendaciones de la Sociedad Español de Fertilidad, con la colaboración de la Asociación Española para el Estudio de la Biología de la Reproducción, de la Sociedad Española de Andrología y de la Sociedad Española de Contracepción*. Adalia. Madrid, 2007: 291-302.

12.- Aboujaoude I, Boulos J and Hachem F. Normal spermatozoa : IVF or ICSI ?. Abstracts of the 15 th Annual Meeting of the ESHRE, 1999. Tours, France.

13.- Payne D, Flaherty SP, Regan Jeffrey, Graham M. Warnes and Colin D. Matthews. Successful treatment of severe male factor infertility in 100 consecutive cycles using intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 1994, 9: 2051-57.

14.- Pampiglione JS, Mills C, Campbell S, Steer C, Kingsland C, Mason BA. The clinical outcome of reinsemination of human oocytes fertilised in vitro. *Fertil Steril*, 1990, 53, 306-10.

15.- Cho S, Piccinni O, Baldini D. May intracytoplasmic sperm injection rescue failed in vitro fertilization cycles?. ASRM Annual Meetings, 1996.

16.- Camacho S, Galán I, Badajoz V, Gragera JA, Cañadas MC, Alemán M, Martínez JV, Bonache R, Lobo S, Martínez de Arenaza A. Niña nacida después de reinseminación con ICSI tras fallo de FIV convencional. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*. Nov-Dic 2005 ; Vol 22. Nº 6: 433-435.

17.- Morton PC, Yoder CS Tucker MJ, Wright G, Brockman WD, Kort HI. Reinsemination by intracytoplasmic sperm injection of 1-day-old oocytes after complete fertilization failure. *Fertil Steril*. 1997 Sep; 68 (3): 488-91.

- 18.- Buceen S, Mulfinger L, Sutterlin M, Schleyer M, Crees W, Steck T. Dizygotic twin pregnancy after intracytoplasmic sperm injection of 1 day old unfertilized oocytes. *Hum Reprod*, 1997; 12 (11): 2560-2.
- 19.- Lipitz S, Rabinovici J, Ben Shlomo I, Bider D, Ben Rafael Z, Mashiach S, Dor J. Complete failure of fertilization in couples with unexplained infertility: Implications for subsequents in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril*, 1993, 59: 348-52.
- 20.- Matthews S, Lavender B, Margara R. Intracytoplasmic sperm injection versus in vitro fertilization with normal semen parameters: outcome is no better with ICSI in cycles with previous poor fertilization. Abstracts of the 15 th Annual Meeting of the ESHRE, Tours, France, 1999.
- 21.- Lundin K, Sjögren A, Hanberger L. Reinsemination of one-day-old oocytes by use of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, 1996, 66: 118-121.
- 22.- Fishel S, Lisi F, Rinaldi L, Aslam I. High insemination concentration (HIC) versus ICSI for conception in vitro. *Reprod Fertil. Dev* , 1995, 7: 169-175.
- 23.- Fishel S, Aslam I, Lisi F, Rinaldi L. Should ICSI be the treatment of choice for all cases of in vitro conception ?. *Hum Reprod* 2000; 15: 1278-83.
- 24.- Kastrop PM, Weima SM, Van Kooij RJ, Te Velde ER. Comparison between ICSI and IVF with high insemination concentration after total fertilization failure in a previous IVF attempt. *Hum Reprod* 1999; 14: 65-9.
- 25.- Tournaye H, Verheyen G, Albano C, Camus M, Van Landuyt L, Devroey P et al. ICSI versus IVF : a randomized controlled trial and a meta-analysis of the literature. *Fertil Steril* 2002; 78: 1030-37.
- 26.- Mau UA, Bäckert IT, Kaiser P, Kiesel L. Chromosomal finding in 150 couples referred for genetic counselling prior to intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 1997, 12: 930-937.

- 27.- Plachot M. The human oocyte. Genetic aspects. *Ann Genet*, 1997, 40: 115-120.
- 28.- Meschede D, De Geyter, Nieschley E, Horst J. Genetic risk in micromanipulative assisted reproduction. *Hum Reprod*, 1995, 10: 2880-2888.
- 29.- Hershlag A, Kaplan EH, Loy RA, De Cherney AH, Law G. Heterogeneity in patient populations explains differences in vitro fertilization programs. *Fertil Steril*, 1991, 56: 913-17.
- 30.- Yovel I, Geva E, Lessing JB, Yaron Y, Botchan A, Amit A. Análisis of the fourth to the eight in vitro fertilization treatments after three previously failed attempts. *Hum Reprod*, 1994, 9: 738-41.
- 31.- Liu DY, Baker HW. Defective sperm-zona pellucida interaction: a major cause of failure of fertilization in clinical in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 2000; 15: 702-708.
- 32.- Mannikko M, Tormala RM, Turi T, Altia A. Association between sequence variations in genes encoding human zona pellucida glycoproteins and fertilization failure in IVF. *Hum Reprod* 2005; 20: 1578-1585.
- 33.- Liu DY, Baker HW. Clinical application of sperm-oocyte interaction test in vitro fertilization-embryo transfer and intracytoplasmic sperm injection programs. *Fertil Steril* 2004; 82: 1251-1263.
- 34.- Wassarman PM, Jovine L, Litscher ES, Qui H, Williams Z. Egg-sperm interactions at fertilization in mammals. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 115 Suppl 1: S57-60.
- 35.- Lui J, Nagy Z, Joris H. Analisis of 76 total fertilization failure cycles out of 2732 intracytoplasmic sperm injection cycles. *Hum Reprod*, 1995, 10, 2630-2636.
- 36.- Expósito A, Castilla J A, Suárez I, Luceño F, Núñez AI, Fontes J, Mendoza N, Martínez L. Actitud ante fallos de FIV e ICSI. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*. Marzo-Abril 2001. Vol 18. N°2: 91-99.

- 37.- Moreno C, Ruiz A, Simon C, Pellicer A, Remohí J. Intracytoplasmic sperm injection as a routine indication in low responder patients. *Hum Reprod*; 13: 2126-29, 1998.
- 38.- Lassa A, Croucher C, Duffy S. One thousand initiated cycles of in vitro fertilization in women > 40 years or age. *Fertil Steril*, 1998, 13: 2126-9.
- 39.- Biljan MM, Buckett WM, Dean N, Phillips J, Tan SL. The outcome of IVF embryo transfer treatment in patients who develop three follicles or less. *Hum Reprod*, 2000, 15, 2140-44.
- 40.- Auger J, Dadoune JP, Schoevaert D. Nuclear status of human sperm cells by transmission electron microscopy and image cytometry: changes in nuclear shape and chromatin texture during spermiogenesis and epididymal transit. *Biol Reprod*; 49: 166-175, 1993.
- 41.- Hammadeh ME, Al-Hassani S, Doerr S, Stieber M, Rosenbaum P, Schmidt W, et al. Association between sperm cell chromatin condensation, morphology based on strict criteria, and fertilization cleavage and pregnancy in a IVF program. *Andrology*; 30/1: 29-35, 1998.
- 42.- Hewitson L, Simerly C and Schatten G. Inheritance difects of the sperm centrosome in humans and its possible role in male infertility, *Int J Androl Suppl* 20/3, 35-43, 1997.
- 43.- Marina S. Avances en el conocimiento de la espermatogénesis. Implicaciones clínicas. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*. Julio-Agosto 2003. Vol 20. Nº 4: 213-225.
- 44.- Núñez R. Parámetros de calidad seminal y fecundante. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*. Ponencia. XXV Congreso Nacional de la SEF. Mayo 2004. La Coruña: 75-84.

- 45.- Almeida PA, Bolton VN. The effect of temperature fluctuations on the cytoskeletal organisation and chromosomal constitution of the human oocyte. *Zygote* 1995; 3:357-65.
- 46.- Whyte W. An introduction to the design of clean and containment areas. In: *Cleanroom Design*. Whyte W. New York: John Wiley & Sons, 1999; 1-20.
- 47.- De los Santos MJ, Romero JL, Cobo A, Gámiz P y Remohí J. Control de calidad en los laboratorios de embriología clínica. En: Remohí. J, Cobo A, Romero JL, Pellicer A, Simón C. *Manual Práctico de Esterilidad y Reproducción Humana*. Madrid. Mc Graw-Hill Interamericana de España S.A.U. 2ª ed. 2005: 328-335.
- 48.- <http://www.sego.es>. Sociedad Española de Obstetricia y Ginecología.
- 49.- Ballesteros A, Paredes O, Landeras J, Nicolás M, Fernández L, Sellés E y Remohí J. Estudio de la pareja estéril. En: Remohí. J, Cobo A, Romero JL, Pellicer A, Simón C. *Manual Práctico de Esterilidad y Reproducción Humana*. Madrid. Mc Graw-Hill Interamericana de España S.A.U. 2ª ed. 2005: 3-14.
- 50.- *Cuadernos de Embriología Clínica*. ASEBIR (Asociación para el estudio de la biología de la reproducción). II.- Criterios de Valoración Morfológicos de Oocitos, Embriones tempranos y Blastocistos Humanos. Comisión de Trabajo ASEBIR. Coordinadores: Ardoy M y Calderón G. Ponentes: Cuadros J; Herrer R; Figueroa Mª J, Moreno JM, Ortiz A, Prados F, Rodríguez L, Santaló J, de los Santos Mª J y Ten J. Madrid. 2007.
- 51.- Scott L. A, Smith S.: The successful use of pronuclear embryo transfer the day following oocyte retrieval. *Human Reprod*. 1998; 13: 1003-1013.
- 52.- Nagy ZP, Liu J, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem A. Time-course of oocytes activation, pronucleus formation and cleavage in human oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 1994. 1994, 9, 1743-1748.

- 53.- Van Wissen B, Wolf JP, Bomsel-Helmreich O, Frydman R, Jouannet P. Timing of pronuclear development and first cleavages in human embryos after subzonal insemination: influence of sperm phenotype. *Hum Reprod* 1995, 10: 642-648.
- 54.- Calderón G, Prados N, Caligara C, Mantuana E, Navarro J, Pellicer A y Remohí J. Calidad embrionaria. Indicadores predictivos de vitalidad. En: Remohí J, Pellicer A, Simón C y Navarro J (eds). *Reproducción Humana*. Madrid. Mc Graw-Hill Interamericana de España S.A.U. 2ª ed. 2002: 463-468.
- 55.- Esfandiari N, Javed MH, Gotlieb L, Casper RF. Complete failed fertilization after intracytoplasmic sperm injection-analysis of 10 years' data. *Int J Fertil Womens Med*. 2005 Jul-Aug; 50 (4): 187-192.
- 56.- Gozlan I, Dor A, Farber B, Meirow D, Feinstein S, Levron J. Comparing intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization in patients with single oocyte retrieval. *Fertil Steril*, 2007, Sep; 88 (3): 754.
- 57.- Moomjy M, Sills ES, Rosenwaks Z, Palermo GD. Implications of complete fertilization failure after intracytoplasmic sperm injection for subsequent fertilization and reproductive outcome. *Hum Reprod*, 1998 Aug; 13 (8): 2212-6.
- 58.- Moreno Sánchez, A (coord.). *Habilidades de comunicación en reproducción asistida*. Grupo de interés de Psicología de la Reproducción. Sociedad Española de Fertilidad. Edikamed, SL. 2008. Madrid.
- 59.- De los Santos JM, Romero JL, Zulategui JF, Pérez S, de los Santos Mª J. Fallo de fecundación total. En: Remohí. J, Cobo A, Romero JL, de los Santos MJ, Pellicer A. *Manual Práctico de Esterilidad y Reproducción Humana. Laboratorio de reproducción asistida*. Madrid. Mc Graw-Hill Interamericana de España S.A.U. 3ª ed. 2008: 189-199.
- 60.- Rawe VY, Olmedo SB, Nodar FN, Ponzio R, Sutovsky P. Cytoskeletal organization defects and abortive activation in human oocytes after IVF and ICSI failure. *Mol Hum. Reprod*. 2000; 6: 510-516.

- 61.- Rawe VY, Olmedo SB, Nodar FN, Ponzio R, Sutovsky P. Abnormal assembly of anúlate lamellae and nuclear pore complexes coincides with fertilization arrest at the pronuclear stage of human zygotic development. *Hum Reprod* 2003; 18: 576-582.
- 62.- Campos I, López D, Muñoz M, Ruzafa C, Miralles F y Magán R. Congelación de Semen. En: Remohí. J, Cobo A, Romero JL, Pellicer A, Simón C. *Manual Práctico de Esterilidad y Reproducción Humana*. Madrid. Mc Graw-Hill Interamericana de España S.A.U. 2ª ed. 2005: 288-291.
- 63.- Muriel L, Garrido N, Fernández JL, Remohí J, Pellicer A, De los Santos MJ, et al. Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2006; 85: 371-383.
- 64.- Kinzer DR, Barrett CB, Powers RD. Prognosis for clinical pregnancy and delivery after total fertilization failure during conventional in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 2008 Aug; 90 (2): 284-288.
- 65.- Laufer N, Tarlatzis BC, DeCherney AH, Masters JT, Haseltine FP, MacLusky N, et al. Asynchrony between human cumulus-corona cell complex and oocyte maturation after human menopausal gonadotropin treatment for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1984; 42: 366-372.
- 66.- Tesarik J, Sousa M. More than 90% fertilization rates after intracytoplasmic sperm injection and artificial induction of oocyte activation with calcium ionophore. *Fertil Steril* 1995; 63: 343-349.
- 67.- Romero JL, Gámiz P, Florensa M, Zulategui JF, de los Santos MJ y Remohí J. La morfología ovocitaria y su repercusión en la FIV. En: Remohí. J, Cobo A, Romero JL, Pellicer A, Simón C. *Manual Práctico de Esterilidad y Reproducción Humana*. Madrid. Mc Graw-Hill Interamericana de España S.A.U. 2ª ed. 2005: 347-357.
- 68.- Balaban B, Urman B. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reprod Biomed Online* 2006; May 12 (5): 608-615.

- 69.- Ou YC, Lan KC, Huang FJ, Kung FT, Hsieh CH, Huang HW. Comparison of in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in extremely low oocyte retrieval cycles. *Fertil Steril*. 2008 Dec. Epub ahead of print.
- 70.- Jaroudi K, Al-Hassan S, Al-Sufayan H, Al-Mayman H, Qeba M, Coskun S. Intracytoplasmic sperm injection and conventional in vitro fertilization are complementary techniques in management of unexplained infertility. *J Assist Reprod Genet*. 2003 Sep; 20 (9): 377-381.
- 71.- Muñoz J, Pellicer J, Herrer R, Mínguez Y, García-Velasco JA. FIV convencional vs. ICSI en bajas respondedoras. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*. Julio-Agosto 2007. Vol. 24- Nº 4: 285-291.
- 72.- Gil Salom M, Romero JL, Ruíz A, Rubio C, Cobo A, Zulategui J, Gámiz P y Remohí J. La ICSI con espermatozoides testiculares. En: Remohí J, Pellicer A, Simón C y Navarro J (eds). *Reproducción Humana*. Madrid. Mc Graw-Hill Interamericana de España S.A.U. 2ª ed. 2002: 339-346
- 73.- Ubaldi F, Nagy ZP, Rienzi L, Tesarik J, Anniballo R, Franco G et al. Reproductive capacity of spermatozoa from men with testicular failure. *Human Reprod* 1999; 14: 2796-2800.
- 74.- <http://www.avancesveterinaria.uchile.cl/>
- 75.- Chemes EH, Rawe YV. Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Hum Reprod Update*. 2003; 9: 405-428.
- 76.- Van Steirteghem A, De Vos A, Staessen C, Devroey P. Should ICSI apply to all IVF cycles?. En: Shoham Z, Howles C, Jacobs H, editores. *Female infertility therapy*. 1 ed. London: Martin Dunitz Ltd, 1999: 243-251.
- 77.- Abu-Hassan D, Al-Hasani S: The use of ICSI for all cases of in-vitro conception. *Hum Reprod* 2003; 18: 893-894.

- 78.- Dumoulin JM, Coonen E, Bras M. Embryo development and chromosomal anomalies alter ICSI: effect of the injection procedure. *Hum Reprod* 2001; 16: 306-12.
- 79.- Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Pfleger U, Tews G. A prospective study on oocyte survival rate after ICSI: influence of injection technique and morphological features. *J. Assist Reprod Genet* 2001; 12:18.
- 80.- Hidekazu S, Takakazu S, Tomoko K, Isoji S, Takeshi K, Masahiko H. Relatively poor quality is an indication for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil and Steril*, 2000, 73: 465-469.
- 81.- <http://www.imbiomed.com>. Hernández Leal, JC. Inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI). Una técnica de reproducción asistida con indicaciones.
- 82.- Bonduelle M, Wilikens A, Buysse A. Prospective follow-up study of 877 children born alter intracytoplasmatic sperm injection (ICSI), with ejaculated epididymal and testicular spermatozoa and alter replacement of cryopreserved embryos obtained alter ICSI. *Hum Reprod*, 1996; 11(4): 131-155.
- 83.- Tarlatzis BC, Bili H. Survey on intracytoplasmis sperm injection : report from the ESHRE ICSI Task Force. *Hum Reprod*, 1998; 13 (Suppl 1): 165-177.
- 84.- Romero JL, Albert C, Zulategui J, Fernández A, Gil-Salom M, Cobo A, Escudero E, Camargo F, Pellicer A y Remohí J. La Microinyección Intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI) como técnica de reproducción asistida. En: Remohí J, Pellicer A, Simón C y Navarro J (eds). *Reproducción Humana*. Madrid. Mc Graw-Hill Interamericana de España S.A.U. 2ª ed. 2002: 443-453.
- 85.- Yuzpe AA, Liu Z, Fluker MR. Rescue intracytoplasmic sperm injection (ICSI)-salvaging in vitro fertilization (IVF) cycles after total or near-total fertilization failure. *Fertil Steril* 2000; 73: 1115-1119.
- 86.- Kuczynski W, Dhont M, Grygoruk C, Pietrewicz P, Redzko S, Szamatowicz M. Rescue ICSI of unfertilized oocytes after IVF. *Human Reprod* 2002; 17: 2423-2427.

- 87.- Van der Westerlaken L, Helmerhorst F, Dieben S, Naaktgeboren N. Intracytoplasmic sperm injection as a treatment for unexplained total fertilization failure or low fertilization after conventional in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2005; 83: 612-617.
- 88.- Yanagida K. Complete fertilization failure in ICSI. *Hum Cell* 2004 Dec; 17 (4): 187-193.
- 89.- Cornet D, Álvarez S, Antoine J, Tibi Ch, Mandelbaum J, Plachot M, et al. Pregnancies following oocyte donation in gonadal dysgenesis. *Hum Reprod*, 1990; 5: 291-293.
- 90.- Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, d'Angelo D, et al. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial. *RBM Online*. Vol 16. N 6. 2008: 835-841.
- 91.- Bartoov B, Berkovitz A, Eltest F, Kogosovsky A, Yagosa A, Lederman H. Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fert Steril* . Vol 80. N 6. Dec 2003: 1413-1419.
- 92.- Wang WH, Meng L, Hackett RJ, Keefe DL. Developmental ability of human oocyte with or without birefringent spindles imaged by PolScope before insemination. *Human Reproduction*. 2001. 16, 1464-1468.
- 93.- Rama Raju GA, Prakash GJ, Krishna KM, Madan K. Meiotic Spindle and zona pellucid characteristics as predictors of embryonic development: a preliminary study using PolScope imaging. *RBM Online*. 2007. 14: 166-174.
- 94.- Moon JH, Hyun ChS, Lee SW, Son WY, Yoon SH, Lim JH. Visualization of the metaphase II meiotic spindle in living human oocytes using PolScope enables the prediction of embryonic development competence after ICSI. *Human Reproduction* 2003. 18: 817-820.

- 95.- Gragera JA., Cañadas MC., Badajoz V., Camacho S., De La Casa M., Díaz AR., Lozano I., Martínez L., Urda C., Gijón J., Alcaraz M., Bonache R., Rodríguez J., Pérez C., Martínez de Arenaza A. Ciclos posteriores en parejas con fallo total de fecundación. Póster N° 70 en el 5° Congreso ASEBIR. Valencia. Noviembre, 2009. *Asebir*. Dic-09. Vol.14. N° 2: 174-175.
- 96.- Carrera-Rotllan J, Estrada-García L, Sarquella-Ventura J. Predicción de las probabilidades de gestación en los ciclos de Fecundación in Vitro. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*. Nov-Dic 2008. Vol. 25. N° 6: 377-386.
- 97.- Huang FJ, Chang SY, Tsai MY, Kung FT, Wu JF, Chang HW. Determination of the efficiency of controlled ovarian hyperstimulation in the gonadotropin-releasing hormone agonist-suppression cycle using the initial follicle count during gonadotropin stimulation. *J Assist Reprod Genet*. 2001; 18 (2): 91-6.
- 98.- László F, Bancsi MMJ, Broekmans JM, Ejikemans MJC, De Jong FH, Habbema JDF, et al. Predictors of poor ovarian response in in vitro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. *Fertil Steril*, 2002; 77 (2): 328-336.
- 99.- Weghofer A, Margreiter M, Fauster Y, Schaetz T, Brandstetter A, Boehm D, et al. Age-specific FSH levels as a tool for appropriate patient counselling in assisted reproduction. *Hum Reprod*, 2005; 20 (9): 2448-2452.
- 100.- Abdalla H, Thum MY. An elevated basal FSH reflects a quantitative rather than qualitative decline of the ovarian reserve. *Hum Reprod*, 2004; 19 (4): 893-898.
- 101.- Greb RR, Grieshaber K, Gromoll J, Sonntag J, Nieschlag E, Kiesel L, et al. A common single nucleotide polymorphism in exon 10 of the human follicle stimulating hormone receptor is a major determinant of length and hormonal dynamics of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005; 90 (8): 4866-4872.
- 102.- Chuang CC, Chen CD, Chao KH, Chen SU, Ho HN, Yang YS. Age is better predictor of pregnancy potential than basal follicle-stimulating hormone levels in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 2003; 79 (1): 63-68.

VIII.- ANEXO: Publicaciones

Artículo Original

Influencia del factor femenino en el fallo de fecundación en parejas estériles sometidas a FIV/ICSI

Female factor influence in fecundation failure among couples underwent IVF/ICSI

Gragera J.A.¹, Zapardiel I², Gijón de la Santa J¹, Bajo - Arenas J. M.²

¹Clínica GINEFIV, Madrid.

²Servicio Ginecología y Obstetricia. Hospital Universitario Santa Cristina, Madrid.

RESUMEN

Objetivos: Determinar la influencia del factor femenino medido mediante la edad, reserva ovárica, respuesta ovárica a la estimulación, calidad ovocitaria y endometriosis en la consecución de embarazo en parejas estériles que realizan ciclos de FIV ó ICSI y que han presentado un fallo de fecundación. **Material y método:** Se ha realizado un estudio clínico retrospectivo no randomizado, sobre un total de 206 ciclos, en donde no se contabilizan parejas receptoras de ovocitos ni de semen de donante, y se compararon con otro grupo, compuesto por 400 parejas que consiguieron embarazo con sus propios gametos, con el diagnóstico de latido cardíaco fetal, confirmado por ecografía en la sexta semana de gestación. Las variables analizadas se recogieron mediante la historia clínica de las parejas, en las que se contemplaban los siguientes datos: datos personales, datos de la mujer, datos del varón, estudio y diagnóstico y tratamiento. **Resultados:** Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) con respecto a la edad de las pacientes en los dos grupos, así como el nivel de FSH basal. El número de ovocitos también fue distinto. Se encontraron diferencias respecto a la indicación de la TRA a favor del factor masculino y femenino en ambos grupos ($p<0.05$ y $p=0.016$ respectivamente). Dentro del factor femenino resultó significativa la presencia de SOP ($p=0.001$). **Conclusiones:** Un ciclo de FIV/ICSI tiene un mal pronóstico en parejas estériles si la edad materna es superior a 37 años; una baja reserva ovárica ($FSH > 10$ mUI/ml) en mujeres estériles es de mal pronóstico para la consecución de embarazo tras ciclos de FIV/ICSI; una buena respuesta ovocitaria, entre 6 y 10 ovocitos maduros, evita muchos fallos de fecundación en parejas estériles, independientemente de la calidad del semen; las parejas estériles con factor masculino y femenino concurrentes supone un factor de mal pronóstico, destacando que la endometriosis no es una indicación femenina clara que pronostique un fallo de fecundación a diferencia del SOP.

PALABRAS CLAVE

Fallo fecundación. Factor femenino. FIV. ICSI

ABSTRACT

Objectives: To determine the female factor influence in fecundation failure among women underwent IVF/ICSI. **Material and Methods:** A retrospective, non-randomized clinical study was carried out among 206 cycles compared to 400 couples who get pregnancy. All variables regarding clinical history of the couple, study, diagnosis and treatment were collected and analyzed. **Results:** We found statistical differences ($p<0.05$) regarding patients' age between groups, as well as basal FSH levels. Number of oocytes was also different between groups. Statistically differences were observed concerning indication of assisted reproduction techniques, with higher proportion of male and female factors between groups ($p<0.05$ and $p=0.016$ respectively). Among female factor, it PCOS presence was statistically significant ($p=0.001$). **Conclusions:** Age over 37 can be considered a bad prognosis factor in IVF/ICSI cycles; Also FSH levels >10 mUI/ml; good prognosis factors are good ovocitary response (between 6 and 10 ovocytes). Male and female factors together are bad prognostic factors, underlining that endometriosis is not a clear female indication factor, at least as good as PCOS.

KEYWORDS

Fecundation failure. Female factor. IVF. ICSI.

INTRODUCCIÓN

Es indudable que los numerosos avances realizados en el campo de la reproducción asistida en los últimos años han conseguido en todo el mundo un aumento en el número de gestaciones. Sin embargo, y a pesar de los cambios introducidos en los laboratorios seguimos encontrándonos con fracasos o fallos de fecundación, ciclos en los que no hay embriones para transferir.

A veces las causas son claras:

- **Factor femenino:** factor etario: a partir de los 37 años se considera edad reproductiva avanzada; factor ovocitario: baja respuesta, mala calidad ovocitaria, gran proporción de ovocitos atresicos o inmaduros en la punción; otros factores femeninos importantes son la endometriosis (patología que incide sobre la fertilidad de forma tan importante que tiene entidad por sí sola) o el síndrome de ovario poliquístico (SOP), que podrían originar una peor calidad ovocitaria.

CORRESPONDENCIA:

Dr. José Antonio Gragera;

Dirección: Clínica GINEFIV

C/ José Silva 18, 28043 Madrid - Spain

Email: joseantoniogragera71@yahoo.es

- **Factor masculino:** una oligo-asteno-terato-necrozoospermia severa, una criptoospermia, una muestra de espermatozoides procedentes de biopsia testicular (TESE, del inglés: "Testicular Sperm Extraction", "Extracción Testicular de Espermatozoides"), o una alteración genética oculta, como un FISH (Fluorescente In Situ Hybridization) alterado de espermatozoides en sémenes aparentemente normales o con un factor leve (astenozoospermias), pueden ser la causa del fracaso de fecundación.

- **Factores de laboratorio como la utilización de una técnica inadecuada:** FIV convencional en vez de ICSI en parejas que han tenido fallos anteriores de inseminación artificial, por ejemplo; o el uso de protocolos de trabajo inadecuados, etc.

En otras ocasiones las causas no son tan claras, cuando tenemos ciclos en los que se han conseguido un número y calidad de ovocitos suficientes, y cuya muestra seminal no es mala.

El fallo de fecundación tras el proceso de FIV convencional o microinyección espermática (ICSI), es un fenómeno que ocurre entre aproximadamente un 11 y un 15% de los ciclos de FIV convencional y en un 3% tras ICSI (1). La reinseminación de estos ovocitos, sin signo de fecundación se propone como alternativa ante un fallo de fecundación, encontrando en la literatura tasas de fecundación por FIV que rondan el 36% y tasa de fecundación por ICSI entre el 60-70% (2).

Ante un fallo de FIV convencional, algunos autores (3, 4) han realizado estudios sobre la incidencia de anomalías en ovocitos, relacionando las aberraciones cromosómicas maternas con la reducción de la tasa de fecundación (5), proponiendo en estos casos la donación de ovocitos. Sin embargo, otros trabajos (6, 7) sugieren que la mejor opción es la realización de un ciclo de ICSI, pues la práctica de un nuevo ciclo de FIV convencional resulta en tasas de fecundación no superiores al 20% (8), y la realización de una ICSI, en este grupo de pacientes, reduce considerablemente el riesgo de un nuevo fallo de fecundación, permitiendo obtener tasas de fecundación superiores al 70% (2). En casos de fallos de fecundación de ICSI por factor masculino severo se podría intentar un nuevo ciclo, pero si el fallo persiste cabe la posibilidad de hacer un próximo ciclo con semen de donante. Las mayores tasas de fecundación tras un fallo en un ciclo de FIV se consiguen en un segundo de ICSI.

El objetivo del estudio fue determinar la influencia del factor femenino medido mediante la edad, reserva ovárica, respuesta ovárica a la estimulación, calidad ovocitaria y endometriosis en la consecución de embarazo en parejas estériles que realizan ciclos de FIV ó ICSI y que han presentado un fallo de fecundación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha realizado un estudio clínico retrospectivo no randomizado, en el que se revisaron las historias clínicas de todas las parejas, que acudieron a consulta por esterilidad o infertilidad y realizaron ciclos de fecundación "in vitro" convencional, microinyección espermática, TESE+ICSI (espermatozoides procedentes de biopsia testicular más microinyección espermática) y técnica mixta (mitad convencional y mitad microinyección) y que han presentado un fallo de fecundación, durante un periodo de 33 meses, desde Octubre de 2.004 a Junio de 2.007, en la clínica GINEFIV de Madrid.

Se estudiaron un total de 206 ciclos, en donde no se contabilizan parejas receptoras de ovocitos ni de semen de donante, y se compararon con otro grupo, compuesto por 400 parejas que consiguieron embarazo con sus propios gametos, con el diagnóstico de latido cardíaco fetal (LFC), confirmado por ecografía en la sexta semana de gestación. Las variables analizadas se recogieron mediante la historia clínica de las parejas, en las que se contemplaban los siguientes datos: datos personales, datos de la mujer, datos del varón, estudio y diagnóstico y tratamiento.

La estimulación ovárica se realizó con la pauta estandarizada para cada paciente, una vez comprobada la desensibilización hipofisaria, se administraron, individualmente, las gonadotropinas en dosis diarias ajustadas en función de la respuesta individual de cada señora, diferenciando entre pacientes normorespondedoras, altas respondedoras y bajas respondedoras y siendo general la pauta de estimulación inducida con una dosis inicial de 100 a 450 UI FSH (Puregon®, Organon o Gonal®, Serono) durante 8-12 días (días 2-7 del ciclo) y complementada con 75 UI de LH-RH (Luveris®, Serono), desde el inicio o a partir de folículos iguales o mayores a 14 mm dependiendo de la pauta de estimulación utilizada.

En las mujeres normorespondedoras, menores de 35 años, con una FSH basal normal y un número de folículos antrales entre 7 y 15, se usa un protocolo largo (pauta larga) de agonistas para la desensibilización hipofisaria, generalmente 0,1 ml de Procrin® desde el día 21 del ciclo previo y dosis de 150-225-300 UI/día de FSH (Puregon® o Gonal®) y LH a partir de folículos de 13-14 mm.

En las altas respondedoras o alta reserva, mujeres con LH/FSH >2, más de 15 folículos antrales en ecografía basal y criterios clínicos de ovario poliquístico, se sigue un protocolo multidosis de antagonistas para la supresión hipofisaria, siendo la dosis inicial de 100-150 UI/día de FSH y administración de LH recombinante el día que se añade el antagonista. También se puede utilizar una pauta larga con análogos.

En las bajas respondedoras, pacientes que no responden de forma suficiente a la estimulación hormonal convencional, mayores de 40 años, con una FSH basal mayor a 10 UI y un número de folículos antrales inferior a 5, también se utilizan los antagonistas para la desensibilización hipofisaria y dosis iniciales de 225-300-400 UI de FSH junto con LH (HMGp altamente purificada, Menopur®, Ferring).

El control del desarrollo folicular se realizó con determinaciones de estradiol sérico y ecografía transvaginal. Una vez conseguido el número suficiente de folículos de buen tamaño (la mayoría entre 16-20 mm) y un nivel de estradiol adecuado al desarrollo folicular, se administró la hCG, en este caso, la hCG-r, recombinante (Ovitrelle®, Serono): una dosis de 250 µg vía subcutánea (6.500 UI) para inducir la ovulación.

La punción folicular, guiada con ultrasonografía transvaginal (ecógrafo modelo Aloka SSD-1700, bomba de vacío modelo Labotect, Aspirator 4014 y aguja de punción 17 G), se llevó a cabo a las 36 horas, aproximadamente, de la toma de la hCG, estando la paciente con anestesia local o total (siendo el porcentaje de éstas últimas mucho menor). En una cabina de flujo laminar, con superficie calefactada y sistema de CO2 acoplado (modelo K-system, IVF Workstation), los ovocitos fueron aspirados del líquido folicular, lavados en sus placas correspondientes de lavado, y colocados en sus respectivas placas de medio de cultivo en el interior de una estufa, o incubador (modelo C200, Labotect), a 37°C y 6 % de CO2, perfectamente identificados. Los medios utilizados para gametos y embriones son los de la serie G III, de Vitrolife, que se caracterizan por estar suplementados, la mayoría de ellos, con Albúmina Sérica Humana (HSA-Solution™, Human Serum Albumin): G-Fert™, G1™ y G2™. Las placas están cubiertas por aceite mineral embriotestado (Ovoil™).

Las muestras de tejido testicular fueron descongeladas tras la obtención de ovocitos en la punción folicular, y capacitadas mediante concentración, lavado y posterior adición de Pentoxifilina (para mejorar la motilidad espermática) en proporción 1:1 a las gotas de medio con espermatozoides procedentes de dicho tejido, si se trataba de un ciclo de TESE+ICSI. Las muestras de ICSI y FIV convencional, tanto las "frescas" como las criopreservadas, se capacitaron mediante gradiente de densidad o mediante "gotitas" si se trataba de un factor masculino severo.

El semen, una vez capacitado (mejorado), se dejó incubando en la estufa, a 37°C y 6% de CO₂, formando gotitas en una placa, cubiertas con aceite mineral (TESE+ICSI y factor masculino severo) o en tubo de fondo cónico, formando un ángulo de 45° para facilitar el "swim-up" de los espermatozoides (FIV convencional e ICSI sin factor masculino severo), todas identificadas con el nombre de la pareja y el número de Historia clínica.

Todos los ovocitos de la FIV convencional fueron inseminados transcurridas unas horas desde la punción folicular. Sólo los ovocitos en metafase II (M-II, maduros), previamente decumulados, mediante acción química (enzima hialuronidasa, Hyase™ -10x, Vitrolife, diluida en una relación 1:9 con el medio Gamete™, Vitrolife) y mecánica (Stripper®), fueron inyectados en microscopio invertido (con óptica Hoffman, Nikon Diaphot 200 y Nikon Eclipse TE-2000-S) y pletina calefactada (Termo Plate®, Tokai Hit, LTD). Una vez fecundados, los ovocitos estuvieron en la estufa hasta el día siguiente, en donde se confirmó la fecundación al cabo de 16-20 horas, en un microscopio invertido (de óptica Hoffman, Nikon), a 40x.

Se consideró como embrión bien fecundado aquél que contenía 2 pronúcleos (PN) y 2 corpúsculos polares (CP), siendo el resto mal fecundados (3 PN, 4 PN), no fecundados (1 CP) o "dudosos" (2CP, 1PN y 2 CP). Los ovocitos fecundados se siguieron manteniendo en cultivo en las mismas condiciones durante 24 ó 48 horas, siendo cambiados de placa a un medio nuevo todos los días.

La calidad embrionaria se valoró previamente a la transferencia, utilizando los criterios de ASEBIR (9) y en base al estudio en D+1 o en estadio de pronúcleos (10), a la valoración a las 27 horas (11, 12), en determinados casos y a los criterios morfológicos: número de células y grado de fragmentación (13), en D+2 y D+3, estableciéndose 4 categorías o calidades, relacionadas con el pronóstico de embarazo: Muy buena (1,0,0,0), Buena (0,1,0,0), Regular (0,0,1,0) y Mala (0,0,0,1). Se hizo especial hincapié en los embriones dados como "dudosos" en día +1, y que, en su mayoría, fueron considerados como embriones viables (si el desarrollo embrionario fue correcto), pero no transferibles en fresco, siendo criopreservados en la mayor parte de los casos. También se valoraron los embriones bloqueados o parados, así como los que presentaban un alto grado de fragmentación,

blastómeras multinucleadas o un ritmo de división inadecuado, considerados todos ellos como no viables.

En los ciclos programados para ello se realizó la técnica del hatching asistido, de tipo químico, con ácido Tyrode o Tyrodes (Acidief Tyrodes Solution, pH 2,3-2,4, Medi Cult), con o sin aspiración de fragmentos.

La transferencia uterina de los embriones se realizó bajo control ecográfico y sondas de tipo rígido (Gynetics, Emtrac Set, Gynetics Medical Products) o más flexibles (Labotect, Embryo Transfer Catheter Set, Labotect). Los embriones no transferidos se criopreservaron para poder ser transferidos en ciclos posteriores (no estudiados). Se realizó soporte de fase lútea con progesterona natural micronizada (Progeffik®, Effik), administrada oral o vaginalmente en dosis de 600 mg/día (en tres dosis de 200 mg), desde el día de la punción. El embarazo se determinó mediante una primera medida de hormona β -hCG en sangre a los 13-15 días post-transferencia, o por un Predictor, prueba en orina, a los 16-18 días post-transfer. La gestación se confirmó con una ecografía a los 21 días post-transferencia. En el estudio se tuvieron en cuenta sólo los embarazos en donde se confirmó la presencia de LFC con una ecografía en la sexta semana de gestación.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa informático SPSS versión 12.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). En el caso de las variables cualitativas, el análisis descriptivo de datos se realizó mediante tablas de distribución de frecuencias absolutas y porcentajes. Las variables cuantitativas se expresaron mediante media y desviación estándar. Para comprobar la normalidad de las distribuciones de las variables se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

Para el análisis de variables cuantitativas con variables cualitativas dicotómicas, se utilizó el test "t" de Student y la prueba de Levene para la igualdad de varianzas. Cuando las variables fueron cualitativas, se utilizó el test de "Chi" Cuadrado. Se estableció un error $\mu = 5\%$ y una potencia del 80%.

RESULTADOS

El resumen de las características del grupo de pacientes que consiguieron embarazo, se resumen en la Tabla 1. Los datos según las técnicas de reproducción asistida se muestran en la Tabla 2.

TABLA 1

Resumen de datos del grupo de embarazadas

	CICLOS	MEDIA \pm DT	MODA	SUMA	%	MINIMO	MAXIMO	RANGO
EDAD	400	33,9 \pm 3,62	34	-	-	22	43	21
FSH (mUI/ml)	400	6,98 \pm 2,93	6	-	-	1	36,8	35,8
FOLICULOS	400	10,73 \pm 4,07	12	4.292	-	2	29	27
OVOCITOS	400	9,19 \pm 4,29	7	3.675	85,62	1	25	24
ATRESICOS	400	0,6 \pm 0,97	0	238	6,48	0	6	6
INSEM	400	7,37 \pm 3,67	6	2.949	80,24	1	20	19

TABLA 2

Resumen de características del grupo de embarazadas según la técnica de reproducción asistida

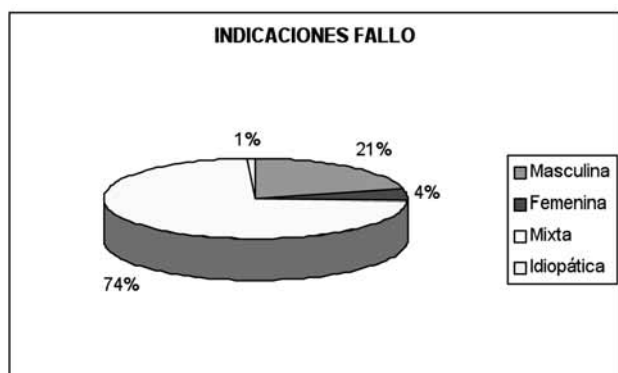
	CICLOS	MEDIA \pm DT	%
FOLIC ICSI	319	10,82 \pm 4,17	80,43
OVOC ICSI	319	9,11 \pm 4,35	79,1
ATR ICSI	319	0,53 \pm 0,91	5,81
INYECT ICSI	319	7,05 \pm 3,64	77,4
FOLIC FIV	81	10,37 \pm 3,65	19,57
OVOC FIV	81	9,48 \pm 4,05	20,9
ATR FIV	81	0,85 \pm 1,17	8,98
INSEM FIV	81	8,63 \pm 3,55	91,02

Del total de las 400 pacientes embarazadas, no todas llegaron a término; hubo 42 abortos y un embarazo ectópico. Por tanto el porcentaje de llegada a término es del 89,25%, si bien es cierto que algunos de los fetos murieron al poco de nacer, bien por malformaciones o por inmadurez; también algunos de los abortos fueron voluntarios (IVE) porque eran incompatibles con la vida. Destaca el gran porcentaje de embarazos múltiples en este grupo, más de la quinta parte (21,28%), con los correspondientes riesgos que ello supone tanto para la madre como para los fetos.

El grupo de pacientes con fallo de fecundación lo forman 206 ciclos consecutivos, cuyas causas se muestran resumidas en la Gráfica 1.

Gráfica 1

Indicaciones en el grupo de fallo de fecundación



De todas ellas las indicaciones femeninas suponen 160 pacientes, entre indicaciones femeninas y mixtas, lo que representa un 77,67% con respecto al resto de factores (masculino, idiopático). En varias pacientes (un total de 86, un 53,75%) hay más de una indicación, lo que hace un total de 287 antecedentes femeninos diferentes. Existen 50 mujeres (31,25%) con 2; 31 (19,37%) con 3; y 5 pacientes (3,12%) hasta con 4 indicaciones distintas.

Lo que en el laboratorio se considera como factor "ovocitario", es decir, ciclos con 3 ó menos ovocitos, o con una gran proporción de ovocitos atresicos o inmaduros, aquí se considera, en algunos casos, como factor ovárico. La tabla 3 resume las principales indicaciones femeninas.

TABLA 3

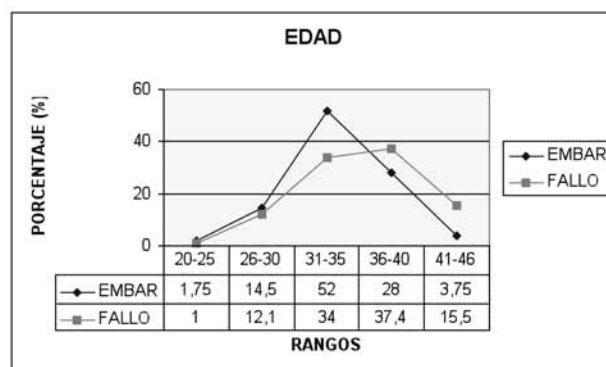
Indicaciones femeninas

Indicación Femenina	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)
Edad	91	31,71
Endometriosis	18	6,27
Ovárica	49	17,07
FSH alta	48	16,72
SOP	24	8,36
Tubárica	28	9,76
Cervical	3	1,05
Uterina	13	4,53
Abortos de repetición	1	0,35
Otras	12	4,18
TOTAL	287	100

La gráfica 2 representa las edades por rangos en ambos grupos, embarazadas y con fallo de fecundación, y su correspondiente porcentaje de pacientes es la que viene a continuación, siendo los distintos rangos de edad: De 20 a 25 años, de 26 a 30, de 31 a 35, de 36 a 40 y de 41 a 46 años. Se trata de una estratificación por rango de quintiles. Las diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos por rangos se enmarcan en color rojo.

Gráfica 2

Edad en los grupos de embarazadas y con fallo de fecundación estratificada por quintiles.



EMBAR: grupo de embarazadas; FALLO: grupo con fallo de fecundación.

En cuanto al resultado del contraste de hipótesis sobre igualdad de varianzas (Prueba de Levene), el valor del estadístico de contraste (F) es 12,208 y el nivel crítico (Sig.) es 0,001. Como este nivel crítico es menor a 0,05, entonces se puede aceptar la hipótesis de varianzas diferentes. Tenemos que ver, por tanto, los resultados del contraste de comparación de medias que hay a continuación de "No se han asumido varianzas iguales". El estadístico de contraste (t) es -5,055, los grados de libertad (gl) son: 348,59 y el nivel crítico, Sig. (bilateral), o "p-valor" es menor a 0,05, por lo que no se debe aceptar la hipótesis nula de que las medias son iguales. Es decir, que hay una diferencia estadísticamente significativa entre las medias en las edades de ambos grupos.

Además si hiciéramos una comparación entre las mujeres que hay con factor etario, es decir, con edades iguales o superiores a los 37 años, observamos que también es estadísticamente significativa dicha diferencia entre los dos grupos. En el grupo de embarazadas las mujeres son 91 (22,75%), mientras que el grupo con fallo de fecundación, a pesar de ser el mismo número, 91, suponen el 44,17%. Utilizando un test de "Chi cuadrado", el valor de "p" es aproximadamente de 0, que al ser menor de 0,05 (siempre con un intervalo de confianza del 95%), nos demuestra lo anteriormente expuesto.

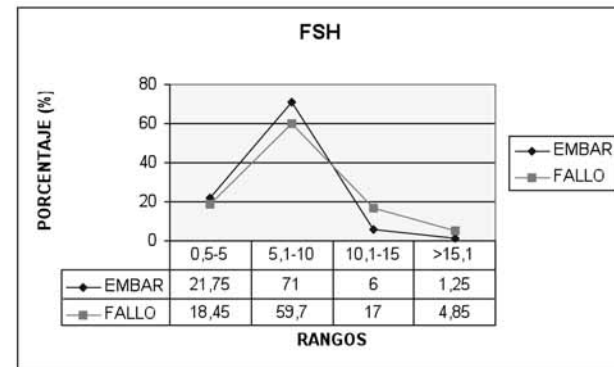
En cuanto a la edad, por rangos, más de la mitad de las pacientes en el grupo gestante (52%) tienen una edad entre 31 y 35 años (en el grupo con fallo hay un 34%) y sólo un 3,75% tienen más de 40 años, porcentaje que alcanza hasta el 15,5% en el grupo con fallo de fecundación, en donde la mayoría de mujeres se sitúa en el rango de edad entre 36 y 40 años (37,4%). Es decir, no sólo hay diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los dos grupos, sino que además el porcentaje de pacientes afeadas es claramente superior en el grupo con fallo de fecundación.

En cuanto al número de pacientes con FSH alta (Gráfica 3), que se podría considerar a partir de 10 mU/ml, en el grupo gestante es de 29 de un total de 400 (7,25%) y en el grupo con fallo de fecundación de 48 de un total de 206 (23,3%). Si se hace una prueba de "Chi cuadrado" también se observan diferencias estadísticamente significativas entre ambos porcentajes (intervalo de confianza del 95% y significancia estadística con "p" <0,05), pues el valor de "p": <0,05.

Las indicaciones de ambos grupos (masculina, femenina, mixta e idiopática) son comparadas en la siguiente tabla 4, observándose diferencias estadísticamente significativas cuando se utiliza una prueba de "Chi cuadrado", en todas ellas excepto en la idiopática o de origen desconocido. Es decir, hay un mayor porcentaje de casos en los que prevalece sólo el factor masculino y sólo el factor femenino en el grupo gestante y de indicación mixta, en donde hay un factor o indicación de esterilidad en ambos miembros de la pareja en el grupo estudio. Y dentro de estas las indicaciones femeninas se subdividen en la tabla 5.

Gráfica 3

FSH en mU/ml en ambos grupos, estratificadas por cuarteles



EMBAR: grupo de embarazadas; FALLO: grupo con fallo de fecundación.

TABLA 4

Comparación entre las indicaciones en los grupos con embarazo y con fallo de fecundación

	Embarazo	Embarazo	Fallo	Fallo		
Indicación	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)	p valor	SIGNIFIC.
Masculina	166	41,5	44	21,36	<0,05	SI
Femenina	40	10	9	4,37	0,016	SI
Mixta	184	46	151	73,3	<0,05	SI
Idiopática	10	2,5	2	0,97	0,2	NO
TOTAL	400	100	206	100		

TABLA 5

Comparación entre las distintas indicaciones femeninas en ambos grupos

Indicación	Embarazo	Embarazado	Fallo	Fallo	p valor	SIGNIFIC.
Femenina	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)	Frecuencia (n)	Porcentaje (%)		
Edad	91	29,07	91	31,71	0,483	NO
Endometr.	23	7,35	18	6,27	0,601	NO
Ovárica	49	15,65	49	17,07	0,638	NO
FSH alta	37	11,82	48	16,72	0,085	NO
SOP	53	16,93	24	8,36	0,001	SI
Tubárica	35	11,18	28	9,76	0,569	NO
Cervical	6	1,92	3	1,05	0,38	NO
Uterina	9	2,85	13	4,53	0,281	NO
Abor de rep	5	1,6	1	0,35	0,124	NO
Otras	5	1,6	12	4,18	0,056	NO
TOTAL	313	99,97	287	100		

DISCUSIÓN

En este estudio, en el que se han comparado una serie de variables, entre un grupo con fallo de fecundación y otro en el que ha habido embarazo, en el mismo periodo de tiempo, se ha llegado a unas conclusiones muy claras y a otras que no lo son tanto. Se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre las medias de edades, FSH al comienzo del ciclo, número de folículos maduros, de ovocitos recuperados tras la punción folicular, de ovocitos maduros (en ICSI) y de ovocitos inseminados; no así en ovocitos atresicos, ni en inmaduros ni madurados (ICSI). Es decir, un ciclo puede ir mal si se cumple alguna de estas circunstancias: mujeres mayores de 37 años, FSH elevada, número de folículos maduros, ovocitos obtenidos e inseminados inferior a 5, o un alto porcentaje de inmadurez o atresia en los ovocitos obtenidos. En un estudio realizado en 2005 sobre datos de 10 años en una clínica canadiense, ya comentan que el número de folículos y ovocitos maduros, así como la edad de la mujer son datos importantes en los ciclos con fallo de fecundación (14).

También hay diferencias en la T.R.A. utilizada (es mejor realizar una técnica mixta que una FIV convencional), el tipo de capacitación de la muestra (mejor gradientes), la indicación (peor pronóstico si es mixta) y, curiosamente, la indicación femenina "S.O.P.", que es significativamente mayor en el grupo de las embarazadas.

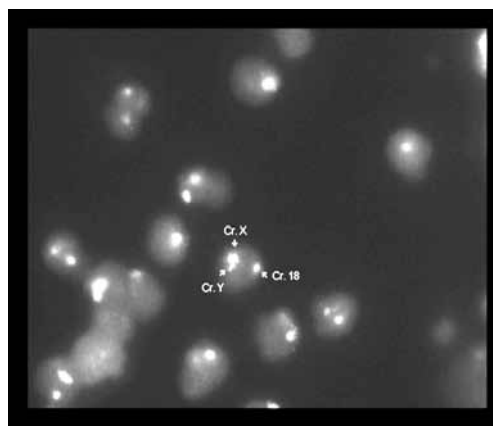
Ante un fallo total de fecundación en FIV cabe la alternativa de rescatar los ovocitos no fecundados mediante ICSI (15, 16), aunque con resultados muy pobres, o dar por cancelado el ciclo, que es lo recomendable, e intentar una ICSI en una próxima ocasión (17). En los fallos de ICSI la única opción es seguir realizando microinyección (18). Si persiste el fallo, habrá que cambiar de gameto.

Cuando se produce un fallo de fecundación puede recomendarse un nuevo ciclo con gametos propios, pues hasta en el 82,64% de los ciclos realizados posteriormente en nuestra clínica en las mismas parejas estudiadas se consiguen embriones (y embarazos en más de una quinta parte), siempre y cuando no haya un resultado de FISH o de fragmentación de ADN espermático alterado.

Hasta en un 45% (22 de 49) de los varones que han tenido muy baja tasa de fecundación o fallo total se observa un FISH alterado, cuando en el total de casos, como el factor masculino, abortos de repetición, mala calidad embrionaria, no embarazo, mixta, factor femenino, cariotipo anómalo y sin indicación, ronda el 23% (56 de 239). En las siguientes figuras se observa un ejemplo de FISH alterado en espermatozoides, en este caso una disomía sexual (figura 1), y un FISH normal.

FIGURA 1

FISH alterado



Una buena solución para los casos de baja respuesta y factor etario sería la donación de ovocitos, que en los últimos años está siendo muy demandada, consiguiéndose altas tasas de gestación. Junto con el fallo ovárico prematuro, serían las indicaciones más frecuentes, que se pueden dividir en dos grandes grupos, en función de la ausencia o presencia de función ovárica (19).

Hasta en un 56,31% de los pacientes con fallo de fecundación se produce en un primer ciclo, un 27,18% en el segundo y sólo un 1,94% en un tercero; se contabiliza hasta casi el 7% (6,79%) las ocasiones en que anteriormente se ha tenido que cancelar un ciclo en estos mismos pacientes, por baja respuesta, crecimiento anómalo de los folículos, etc, y como dato importante: hasta casi un 8% (7,76%) de estas parejas han tenido embarazos anteriores en reproducción asistida, lo que vuelve a dar idea de que cada ciclo es diferente.

En cuanto a los ciclos de FIV/ICSI anteriores estudiados en el grupo con fallo de fecundación se han verificado un total de 97 en 80 parejas (el 38,83%), consiguiéndose llegar a la transferencia embrionaria en 65 de ellas (81,25%) y al niño sano en casa en tan sólo 6 ocasiones de los 17 embarazos finales (tasa de gestación/señora del 26,15%); estos datos suponen un éxito del 35,3% frente al elevado 64,7% de aborto y de únicamente un 6,19% si se contabilizan los 97 ciclos iniciados, lo que da idea de la dificultad del embarazo a término en este tipo de pacientes.

Además si se cuentan también los ciclos anteriores de IAC: de 109 tratamientos realizados en la clínica Ginefiv en 36 pacientes (un 17,48% del total del grupo) tan sólo en 1 ocasión (0,92%) ocurrió el embarazo, que terminó en aborto, datos que ponen de manifiesto, una vez más, que este grupo es realmente complejo de tratar con éxito.

Si estudiamos además, los ciclos posteriores que se han realizado este tipo de parejas, observamos los siguientes datos: de las 206, hasta 80 no volvieron a la clínica, pero se conoce de la existencia de, al menos 4 gestaciones espontáneas, una acabada en aborto. De las 126 parejas restantes, 125 realizan al menos un ciclo de FIV/ICSI (1 se canceló por baja respuesta) y otra se hizo un ciclo de IAD (Inseminación Artificial de Donante). Hasta 24 de las 124 (19,35%) hicieron más de un tipo de ciclo, es decir, de gametos propios y de donación (sólo uno o ambos): un total de 207, repartidos entre 121 propios (58,45%) y 81 (41,55%) de "donación", de los que hubo transferencia embrionaria en el 85,99% (178).

En los ciclos posteriores al fallo de fecundación con gametos propios (121) se observó un nuevo fallo en el 17,36% (21), pero también hubo 28 embarazos (23,14% de tasa de gestación/ciclo), con un 61,71% de evolución a término (17). En los restantes 81 ciclos, de "donación", se consiguieron 32 embarazos (37,21%), con un 78,13% (25) de "niño sano en casa".

Aunque hay diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de embarazo/ciclo ($p: 0,028$), no se da en la tasa de evolución ($p: 0,14$) si comparamos ciclos posteriores con gametos propios o donados en parejas con fallo de fecundación. Se puede recomendar realizar otro ciclo a estas parejas teniendo en cuenta que en más del 80% de los ciclos posteriores se consiguen embriones, y hasta embarazo en casi la quinta parte, siempre y cuando un resultado de FISH y fragmentación espermática sean normales. Hay que intentar agotar todas las posibilidades para conseguir un hijo biológico, pero con dos fallos de fecundación lo más recomendable es cambiar de gameto.

CONCLUSIONES

Por tanto podríamos concluir que es importante intentar saber o averiguar en qué medida puede influir en un ciclo cada uno de los factores estudiados, teniendo en cuenta que un ciclo de FIV/ICSI tiene un mal pronóstico en parejas estériles si la edad materna es superior a 37 años; una baja reserva ovárica ($FSH > 10$ mUI/ml) en mujeres estériles es de mal pronóstico para la consecución de embarazo tras ciclos de FIV/ICSI; una buena respuesta ovocitaria, entre 6 y 10 ovocitos maduros, evita muchos fallos de fecundación en parejas estériles, independientemente de la calidad del semen; las parejas estériles con factor masculino y femenino concurrentes supone un factor de mal pronóstico, destacando que la endometriosis no es una indicación femenina clara que pronostique un fallo de fecundación. Se debe aconsejar a la pareja antes de comenzar el mismo si realmente merece la pena seguir adelante, sabiendo que la suma de dichas variables disminuye la posibilidad del embarazo, e incluso de que no haya embriones. Algunas de las razones que pueden desaconsejar la continuación del ciclo podrían ser los motivos económicos y los estadísticos para cualquier centro de reproducción asistida, pues siempre se trataría de casos con malos resultados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aboujaoude I et al. Normal spermatozoa: IVF or ICSI ?. Abstracts of the 15 th Annual Meeting of the ESHRE, 1999. Tours, France.
2. Payne D, Flaherty SP et al. Successful treatment of severe male factor infertility in 100 consecutive cycles using intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod, 1994, 9: 2051-57.
3. Mau UA et al. Chromosomal finding in 150 couples referred for genetic counselling prior to intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod, 1997, 12: 930-937.
4. Plachot M. The human oocyte. Genetic aspects. Ann Genet, 1997, 40: 115-120.
5. Meschede D, De Geyter et al. Genetic risk in micromanipulative assisted reproduction. Hum Reprod, 1995, 10: 2880-2888.
6. Hershtlag A, Kaplan EH et al. Heterogeneity in patient populations explains differences in vitro fertilization programs. Fertil Steril, 1991, 56: 913-17.
7. Yovel I, Geva E et al. Análisis of the fourth to the eight in vitro fertilization treatments after three previously failed attempts. Hum Reprod, 1994, 9: 738-41.
8. Fishel S, Aslam I, Lisi F et al. Should ICSI be the treatment of choice for all cases of in vitro conception ?. Hum Reprod 2000; 15: 1278-83.
9. Cuadernos de Embriología Clínica. ASEBIR (Asociación para el estudio de la biología de la reproducción). II.- Criterios de Valoración Morfológicos de Oocitos, Embriones tempranos y Blastocistos Humanos. Comisión de Trabajo ASEBIR. Coordinadores: Arday M y Calderón G. Ponentes: Cuadros J; Herrer R; Figueroa Mª J, Moreno JM, Ortiz A, Prados F, Rodríguez L, Santaló J, de los Santos Mª J y Ten J. Madrid. 2007.
10. Scott L. A, Smith S.: The successful use of pronuclear embryo transfer the day following oocyte retrieval. Human Reprod. 1998; 13: 1003-1013.

11. Nagy, Z et al. Time-course of oocytes activation, pronucleus formation and cleavage in human oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 1994. 1994, 9, 1743-1748.
12. Van Wissen B et al: Timing of pronuclear development and first cleavages in human embryos after subzonal insemination: influence of sperm phenotype. *Hum Reprod* 1995, 10: 642-648.
13. Calderón G, Prados N, Caligara C, Mantuana E, Navarro J, Pellicer A y Remohí J. Calidad embrionaria. Indicadores predictivos de vitalidad. En: Remohí J, Pellicer A, Simón C y Navarro J (eds). *Reproducción Humana*. Madrid. Mc Graw-Hill Interamericana de España S.A.U. 2ª ed. 2002: 463-468.
14. Esfandiari N, Javed MH, Gotlieb L, Casper RF. Complete failed fertilization after intracytoplasmic sperm injection-analysis of 10 years' data. *Int J Fertil Womens Med*. 2005 Jul-Aug; 50 (4): 187-192.
15. Yuzpe AA, Liu Z, Fluker MR. Rescue intracytoplasmic sperm injection (ICSI)-salvaging in vitro fertilization (IVF) cycles after total or near-total fertilization failure. *Fertil Steril* 2000; 73: 1115-1119.
16. Kuczynski W, Dhont M, Grygoruk C et al. Rescue ICSI of unfertilized oocytes after IVF. *Human Reprod* 2002; 17: 2423-2427.
17. Van der Westerlaken L, Helmerhorst F, Dieben S et al. Intracytoplasmic sperm injection as a treatment for unexplained total fertilization failure or low fertilization after conventional in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2005; 83: 612-617.
18. Yanagida K. Complete fertilization failure in ICSI. *Hum Cell* 2004 Dec; 17 (4): 187-193.
19. Bosch E, Bellver J, Escudero E, Pellicer A, Rodríguez M, Vidal C, Gaytán J y Remohí J. Donación de ovocitos. En: Remohí J, Pellicer A, Simón C y Navarro J (eds). *Reproducción Humana*. Madrid. Mc Graw-Hill Interamericana de España S.A.U. 2ª ed. 2002: 489-498.